PRIMÄRKULTUREN VON RATTENHEPATOCYTEN ALS MODELL-SYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DER BILIÄREN SEKRETION UND DER INTRAHEPATISCHEN CHOLESTASE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Wilhelm Jung

aus Monreal

1983

PRIMÄRKULTUREN VON RATTENHEPATOCYTEN ALS MODELL-SYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DER BILIÄREN SEKRETION UND DER INTRAHEPATISCHEN CHOLESTASE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Wilhelm Jung

aus Monreal

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.4.1983

Dekan: Prof.Dr.J.Strähle

1. Berichterstatter: Prof.Dr.D.Mecke

2. Berichterstatter: Prof.Dr.A.Wendel

Meinen Eltern

Abstract

JUNG; WILHELM:

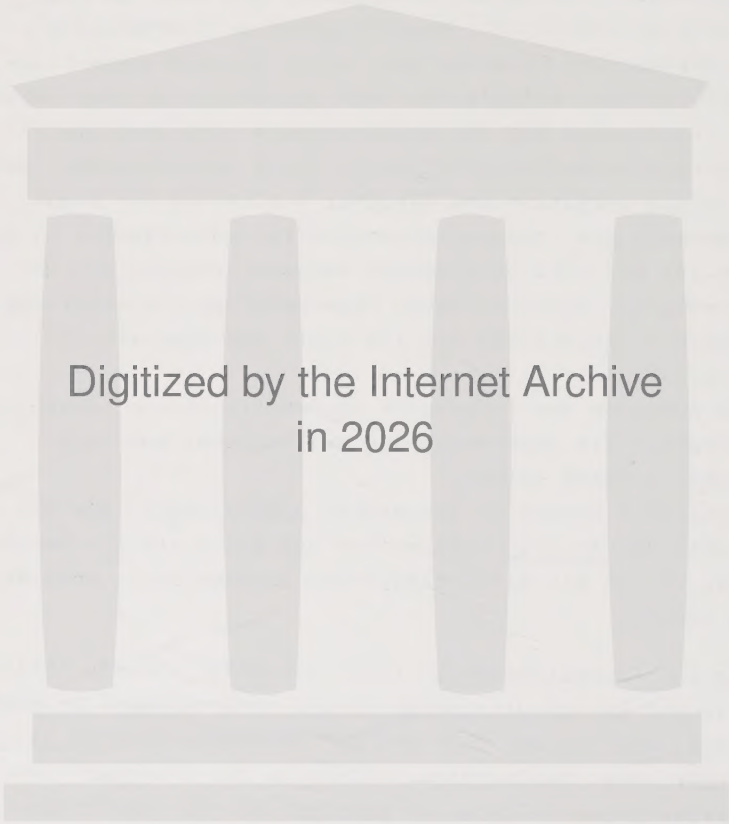
PRIMÄRKULTUREN VON RATTENHEPATOCYTEN ALS MODELLSYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG DES BILIÄREN TRANSPORTS UND DER INTRAHEPATISCHEN CHOLESTASE

Für die Untersuchung des biliären Anionentransports wurden durch Kopplung verschiedener Aminosäuren und Amine an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Modellsubstanzen synthetisiert, die als Derivate des Fluoresceins, eines gallegängigen Fluoreszenzfarbstoffes, aufzufassen sind. Es konnte gezeigt werden, daß sich Fluorescein und die verschiedenen FITC-Derivate in ihrem Transportverhalten prinzipiell nicht unterscheiden, daß aber durch die Variation von Struktur und Ladung der Kopplungskomponente die Transporteigenschaften beeinflußbar sind. Allgemein ist der hier untersuchte Anionentransport in der Hepatocytenkultur durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

- Er erfolgt transzellulär und ist durch Phenobarbital stimulierbar.
- Für die Aufnahme der Farbstoffe sind Natriumionen notwendig.
- Die Sekretion ist unabhängig von der Aufnahme und kann reversibel gehemmt werden.
- Die Farbstoffe werden in Strukturen angereichert, die den Gallekanälchen in vivo entsprechen und die durch die Behandlung der Zellen mit einer hypertonen Sucroselösung entleert werden können.

Mit Hilfe von Taurolithocholat (TLC) und Chlorpromazin (CPZ) konnten in der Kultur ultrastrukturelle Veränderungen erzeugt werden, die jenen in der TLC- und der CPZ-Cholestase in vivo vergleichbar sind. Darüberhinaus lieferte die Anwendung des Polyenantibiotikums Filipin, in Kombination mit elektronenmikroskopischen Methoden, neue Erkenntnisse über die Verteilung des Membrancholesterins,insbesondere in der TLC-Cholestase.

TLC entfaltete seine Wirkung besonders im Bereich der Gallekanälchen, während vom CPZ mehr generalisierte Schädigungen der zellulären Membranen ausgingen.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0011

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke und Herrn Dr. R. Gebhardt in der Zeit von April 1980 bis März 1983 am Lehrstuhl II des Physiologisch-Chemischen Institutes der Universität Tübingen durchgeführt.

Hernn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für sein Interesse und für die großzügige Förderung meiner Arbeit, insbesondere für die vorbehaltlose Unterstützung beim Aufbau der Elektronenmikroskopie.

Herrn Dr. R. Gebhardt schulde ich für seine selbstverständliche Bereitschaft, bei der Lösung von Problemen mitzuhelfen und für seine motivierende Anleitung großen Dank.

Herrn Dr. H. Frank vom Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen und seinen Mitarbeitern möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft und Beratung in elektronenmikroskopischen Fragen herzlich danken.

Den Herren Dr. H. Robenek, Münster und Dr. H.J.M. Kempen, Leiden, bin ich durch eine über Universitätsgrenzen hinausgehende, kollegiale und fruchtbare Zusammenarbeit sehr verbunden.

Fr. M. Behringer und Fr. A. Schneck danke ich für ihre Unterstützung bei der Zellkultivierung und bei der Durchführung fotografischer Arbeiten.

Der "Studienstiftung des Deutschen Volkes" und der "Gerhard Rösch Stiftung" gilt mein Dank für die großzügig gewährten Stipendien.

Ganz besonderen Dank schulde ich meiner Frau Christine, die im Verlaufe der letzten drei Jahre mancherlei Unbill selbstverständlich hingenommen hat. Sie hat auf ihre Weise ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen meinen Laborkollegen danke ich für ein angenehmes, von Hilfsbereitschaft getragenes Klima, ohne das eine Arbeit nur schwer gedeihen kann.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	IX
1.	Einleitung	1
1.1.	Zusammensetzung der Galle	1
1.1.1.	Wasserlösliche Bestandteile	1
1.1.2.	Lipidlösliche Bestandteile	2
1.2.	Mechanismen des Transports	4
1.3.	Störungen des Galleflusses: Cholestase	10
1.3.1.	Definition und Erscheinungsbild	10
1.3.2.	Experimentell erzeugte Cholestase	12
1.3.2.1.	Ligatur des ductus choledochus	12
1.3.2.2.	Taurolithocholsäure	13
1.3.2.3.	Äthinylöstradiol	14
1.3.2.4.	Alkaloide	15
1.3.2.5.	Chlorpromazin	16
1.3.3.	Theorien über Ursachen der intrahepatischen Cholestase	18
1.4.	Die Hepatocytenkultur als experimentelles System	19
1.5.	Ultrastruktureller Nachweis von Cholesterin mittels Filipin	21
1.6.	Problemstellungen der vorliegenden Arbeit	23
2.	Materialien und Methoden	25
2.1.	Versuchstiere	25
2.2.	Geräte	25
2.3.	Verbrauchsmittel	26
2.3.1.	Materialien	26

2.3.2.	Chemikalien, Hormone	26
2.4.	Lösungen und Kulturmedien, Isolierung und Kultivierung der Hepatocyten	28
2.5.	Aufarbeitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie	28
2.5.1.	Einbettung der Zellen als Suspension	28
2.5.2.	Ablösen der Zellen mit Trypsin	29
2.5.3.	Aufbereitung der Kulturen für den Gefrierbruch	30
2.5.4.	Filipin-Behandlung	30
2.6.	Behandlung der Kulturen mit Cholestase-Agenzien	31
2.6.1.	Taurolithocholat	31
2.6.2.	Chlorpromazin	31
2.7.	Fluorescein und Derivate des Fluoresceinisothiocyanats	31
2.7.1.	Fluorescein	31
2.7.2.	Derivate des Fluoresceinisothiocyanats	32
2.8.	Hank's-Lösung ohne Natrium	36
2.9.	Hemmstoffe	36
2.9.1.	Ouabain	36
2.9.2.	Fluoresceinamin	37
2.10.	Behandlung der Zellen mit Sucroselösung	37
2.11.	Stimulierende Agenzien	37
2.11.1.	Hormone	37
2.11.2.	Phenobarbital	38
3.	Ergebnisse	
3.1.	Ultrastruktur der kultivierten Hepatocyten	39

3.1.1.	Die Organellen	39
3.1.2.	Die Verteilung von Filipin-Cholesterin-Komplexen auf der Plasmamembran	43
3.2.	Die Gallekanälchen in der Kontrollkultur	44
3.2.1.	Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild	44
3.2.2.	Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild	44
3.3.	Einfluß von Taurolithocholat auf die Ultrastruktur	45
3.4.	Einfluß von Chlorpromazin auf die Ultrastruktur	47
3.5.	Anionentransport	49
3.5.1.	Die Darstellung und dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe	49
3.5.2.	Der Unterschied zwischen dem Fluorescein- und dem Gly-FITC-Transport	50
3.5.3.	Der Einfluß von Phenobarbital auf den Transport des Gly-FITC	50
3.5.4.	Sucrosebehandlung	51
3.5.5.	Hemmung des Transports von Gly-FITC	52
3.5.5.1.	Entzug von Natrium	52
3.5.5.2.	Ouabain	52
3.5.5.3.	Fluoresceinamin	52
3.5.6.	Andere Aminosäuren als Kopplungskomponenten, Carboxyfluorescein	53
3.5.7.	Methylamin-FITC und Benzylamin-FITC	54
4.	Diskussion	55
4.1.	Ultrastrukturelle Untersuchungen	55

4.1.1.	Die Ultrastruktur von Gallekanälchen in der Kontrollkultur	55
4.1.2.	Filipin als cytochemischer Cholesterin-marker	57
4.1.3.	Der Einfluß von Taurolithocholat auf die Ultrastruktur	58
4.1.4.	Der Einfluß von Chlorpromazin auf die Ultrastruktur	62
4.2.	Anionentransport	66
4.2.1.	Allgemeines	66
4.2.2.	Der Unterschied zwischen dem Fluorescein- und dem Gly-FITC-Transport	68
4.2.3.	Der Einfluß der Kopplungskomponente auf das Transportverhalten der FITC-Derivate	70
4.2.4.	Die Hemmung des Gly-FITC-Transports	71
4.2.5.	Sucrosebehandlung	75
4.2.6.	Die Stimulierung des Gly-FITC-Transports durch Phenobarbital	76
4.3.	Die Monolayerkultur als Modellsystem zur Untersuchung der biliären Polarität	78
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis	85
	Bildanhang	

Verzeichnis der Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BSP	Bromosulphophthalein, synonym mit Sulfobromophthalein
Cacodylat	Dimethylarsinsäure-Natriumsalz
CPZ	Chlorpromazin
E-Seite	ectoplasmatische Seite der gebrochenen Membran
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g-GT	gamma-Glutamyltranspeptidase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gly-FITC	N-Glycyl-N'-Fluoresceinyl-Thioharnstoff; die Abkürzungen der übrigen FITC-Derivate finden sich auf S. 34.
HDL	High Density Lipoprotein
Hepes	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin Äthansulfonsäure
ICG	Indocyanin Grün
LP-X	Lipoprotein X
Mg-ATPase	Mg^{++}-abhängige Adenosintriphosphatase
NaK-ATPase	Na^{+}-K^{+}-abhängige Adenosintriphosphatase
P-Seite	protoplasmatische Seite der gebrochenen Membran
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
sER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
T_3	Trijodthyronin
TLC	Taurolithocholat
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. Einleitung

Eine der zentralen Aufgaben der Leber ist die Produktion und Sekretion von Galle. In den Hepatocyten produziert, wird sie als Primärgalle in die Gallekanälchen sezerniert und gelangt über die abführenden Gallegänge in die Gallenblase bzw. direkt in den Dünndarm. Auf diesem Wege wird sie durch Rückresorption von Elektrolyten und Wasser durch die Gallegangsepithelien verändert.

Eine direkte Entnahme von Primärgalle ist auf Grund des geringen Durchmessers der Gallekanälchen (< 1µm) bislang nicht möglich, sodaß über deren genaue Zusammensetzung keine Daten vorliegen; alle Angaben bezüglich der Galleinhaltsstoffe wurden durch Analyse von Blasengalle bzw. von Punktaten des Hauptgalleganges gewonnen. Infolgedessen gibt es auch über die molekularen Prozesse bei der Galleproduktion und -sekretion keine gesicherten Erkenntnisse.

1.1. Zusammensetzung der Galle

1.1.1. Wasserlösliche Bestandteile

Die Bestandteile der wasserlöslichen Fraktion der Galle sind vor allem anorganische Ionen, deren Konzentration derjenigen des Blutplasmas weitgehend entspricht (39,52). Natrium ist mit 145-165 mM das wichtigste unter ihnen; als weitere Kationen kommen Kalium, Calcium und Magnesium vor; Chlorid und Hydrogencarbonat sind die wesentlichen Anionen.

In geringer Konzentration finden sich in der Galleflüssigkeit

gelöste Proteine wie z.B. Albumin (32), Ectoenzyme der Plasmamembran (32), lysosomale Enzyme (8,32), Immunoglobulin A (80, 97,113) und Insulin (114). Zum Teil werden diese Proteine über die Galle ausgeschieden (Insulin), andere gelangen auf diesem Wege zu ihrem Funktionsort (IgA), bei einigen ist der Grund für ihre Anwesenheit in der Galle unbekannt (Enzyme, Albumin).

In die dritte Gruppe der wasserlöslichen Verbindungen gehören organische Anionen (108,130), organische Kationen und neutrale Xenobiotica (86). Sie können wie das Bilirubin endogener, oder, wie Arzneimittel und verschiedene Farbstoffe - z.B. Fluorescein, Sulfobromophthalein (BSP) und Indocyanin Grün (ICG) - exogener Natur sein. Zum Teil müssen diese Fremdstoffe im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatocyten zu wasserlöslichen Verbindungen metabolisiert werden, bevor sie in die Galle ausgeschieden werden können (1).

1.1.2. Lipidlösliche Bestandteile

Die wesentlichen Gallelipide sind Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipide. Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin gebildet; ihr Syntheseweg stellt gleichzeitig den Hauptabbauweg des Cholesterins dar. Der größte Teil der Gallensäuren liegt als Taurin- bzw. Glycinkonjugate vor, mit pK-Werten deutlich unter dem physiologischen pH-Wert der Galle (32). Daher können die Gallensäuren auch zu den Anionen gezählt und als sogenannte Gallensalze angesprochen werden.

Nur ein Teil der täglich sezernierten Gallensäuren wird neu synthetisiert. Diese primären Gallensäuren, vor allem die Trihydroxysäure Cholat und die Dihydroxysäure Chenodesoxycholat,

werden zu einem erheblichen Anteil aus dem Darm zurückresorbiert und im enterohepatischen Kreislauf der Leber erneut zugeführt. Ein durchschnittliches Gallensäuremolekül zirkuliert 10-20 mal, bis es den enterohepatischen Kreislauf via faeces verläßt (53). Durch die Tätigkeit der Darmflora kommt es zu einer teilweisen Dehydroxylierung des Steroidkerns, wodurch aus Cholsäure die Desoxycholsäure und aus Chenodesoxycholsäure die Lithocholsäure entstehen. Auch diese sogenannten sekundären Gallensäuren gelangen mit dem Pfortaderblut zur Leber und bestimmen zusammen mit den primären Gallensäuren das Ausmaß der Gallensäureneusynthese. Für eine detaillierte Beschreibung des Gallensäurestoffwechsels sei auf die einschlägige Literatur verwiesen (10,22,23,52,92).

Als amphiphile Moleküle besitzen die Gallensäuren die Fähigkeit, mit Cholesterin und Phospholipiden sogenannte gemischte Mizellen zu bilden. Alle drei Komponenten müssen in einem bestimmten Verhältnis vorliegen, damit die Ausbildung der Mizellen möglich ist (52). Für das schwerlösliche Cholesterin ist dies die einzige Möglichkeit, in Lösung zu gehen. Wird in der Galle die sogenannte kritische mizelläre Konzentration überschritten, kommt es zur Kristallisation und fortschreitend zur Bildung von Cholesteringallensteinen (52). Da jedoch für das gesamte Cholesterin, also sowohl für endogen synthetisiertes als auch für Nahrungscholesterin, der Weg in die Galle die einzig nennenswerte Möglichkeit der Ausscheidung ist, entweder als Cholesterin selbst oder aber nach der Umwandlung zu Gallensäuren (52), ist die Erhaltung der Balance zwischen Cholesterin-, Gallensäuren- und Phospholipidkonzentration für die Leber ein zentrales Problem.

1.2. Mechanismen des Transports

Theorien über die molekularen Ereignisse des biliären Transports haben sich parallel mit Erkenntnissen über Transportvorgänge in anderen Organen entwickelt (58). Es gelten hier wie dort die gleichen physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten. Wie diese jedoch im Falle des Transportes der Gallebestandteile in Form von biochemischen Mechanismen realisiert sind, ist bisher noch recht wenig verstanden.

Für die Beschreibung des biliären Transports ist es hilfreich, ihn in drei Abschnitte zu untergliedern:

- Aufnahme gallegängiger Substanzen an der Sinusoidalmembran
- transzellulärer Transport
- Sekretion in die Gallekanälchen

Diese Reihenfolge ist Ausdruck eines streng gerichteten Vorgangs.

Die Aufnahme von Stoffen wie z.B. organischen Anionen oder Gallensäuren aus dem Blut führt zu einer intrazellulären Anhäufung; sie muß also gegen ein Konzentrationsgefälle geschehen und benötigt dazu entsprechende Antriebskräfte. Als Möglichkeit dafür kommen ein aktiver Transport oder aber eine erleichterte Diffusion in Kombination mit intrazellulären Bindungsproteinen in Frage. Für einen Carrier-vermittelten, aktiven Mechanismus spricht die Tatsache, daß sowohl für die Aufnahme von Gallensäuren als auch von organischen Anionen kompetitive Hemmbarkeit, Abhängigkeit von Natrium und Ouabainhemmbarkeit gefunden wurden (12,58,108,110,132). Ein weiteres Indiz liefern Reichen und Berk (108) mit der Beschreibung von spezifischen Bindeproteinen in der Sinusoidalmembran. Die gegenüber dem Plasma erhöhte Konzen-

tration von Gallensäuren - < 10 µM im systemischen Blut (53), 100-300 µM in der Leber (8) - und die Sättigungskinetik der Aufnahme (108,110) können aber auch durch die Anwesenheit von intrazellulären Bindungsproteinen erklärt werden. Für Bilirubin und Xenobiotica werden Z-Protein und Ligandin als hochaffine Proteine beschrieben (2,3), während bezüglich der Gallensäuren keine endgültige Klarheit über die intrazelluläre Lokalisation besteht (53); im Blut werden sie an Albumin und HDL gebunden transportiert (74). Wahrscheinlich ist, daß spezifische Carrier für die verschiedenen Substanzklassen existieren, daß aber auch die Bindung an intrazelluläre Proteine für die Aufnahme und für den transzellulären Transport von Bedeutung ist.

Der transzelluläre Transport und die Sekretion in den Canaliculus gehen mit dem Fluß von Wasser einher. Zur Beantwortung der bisher ungelösten Frage nach der treibenden Kraft dieses Flusses gibt es verschiedene Theorien. Die populärste geht davon aus, daß durch die Sekretion der Gallebestandteile in die Gallekanälchen ein osmotischer Gradient aufgebaut wird, der den Strom von Wasser nach sich zieht. Betrachtet man den Gallefluß in Abhängigkeit der Gallensäuresekretion, so ergibt sich ein direkter Zusammenhang: eine erhöhte Gallensäureausscheidung bedingt eine gesteigerte Cholerese. Man nennt dieses Phänomen gallensäureabhängigen Gallefluß. Die These, daß die Sekretion von Gallesäuren in den Canaliculus für den Nachstrom von Wasser und darin gelöster Elektrolyten verantwortlich ist, wurde bereits von Sperber (141) aufgestellt und ist bis heute Diskussionsgrundlage geblieben (8,13).

Die Gallensäuren alleine können jedoch nicht für den Gesamtgallefluß verantwortlich gemacht werden, da bei sehr niedrigen Gallensäurekonzentrationen oder bei ihrer Abwesenheit, z.B. bei einer Gallefistel, die Cholerese nicht zum Erliegen kommt. Man nennt diesen Anteil den gallensäureunabhängigen Gallefluß (33). Er kann möglicherweise auf die Sekretion von organischen Anionen wie Bilirubin zurückgeführt werden, die wahrscheinlich über einen anderen Carrier die biliäre Membran passieren als die Gallensäuren (31), oder aber auf die Ausscheidung von Hydrogencarbonat (51).

Ein Carrier-vermittelter Mechanismus ist ebenso wie für die Aufnahme an der Sinusoidalmembran für den Transport der Gallebestandteile über die canaliculäre Membran zu fordern: die Gallensäurekonzentration in der Galle ist um einen Faktor >20 höher als in der Zelle (8), der Prozeß ist sättigbar (32) und hängt von der Anwesenheit von Natriumionen ab (48). Kürzlich wurden von Kramer et al. (73) auch Proteine in der Membran der Gallekanälchen beschrieben, an die Gallensäuren spezifisch binden.

Als eine weitere Möglichkeit wird ein vesikulärer Transport sowohl für Gallensäuren wie auch für Proteine vorgeschlagen (14,114, 138). Hofmann (53) diskutiert einen Weg, nach dem Gallensäuren die Synthese von Phospholipiden anregen, welche Vesikel ausbilden, via Golgi zum Gallepol wandern und dort mit der Membran fusionieren. In diesem Zusammenhang ist auch eine Beteiligung des Cytoskeletts an der Gallesekretion denkbar, da die Translokation von Vesikeln vermutlich von kontraktilen Elementen abhängt (13). Insbesondere spricht dafür die Tatsache, daß durch die Zerstörung des Cytoskeletts der Gallefluß unterbrochen werden kann (29).

Die Frage, was für die starke Konzentrierung der Gallebestand-

teile in der Galleflüssigkeit gegenüber dem intrazellulären Raum verantwortlich ist, wird von den obigen Ausführungen nur zum Teil beantwortet. Eine Möglichkeit besteht in einem energieabhängigen, aktiven Transport, der gegen ein Konzentrationsgefälle arbeiten kann. Eindeutige Hinweise für die Existenz eines solchen Mechanismus, etwa die Lokalisierung eines Enzyms, das definitiv die Translokation eines bestimmten Galleinhaltsstoffes bewerkstelligen würde, liegen bisher nicht vor. Wohl sind einige Enzyme, wie die Alkalische Phosphatase (E.C. 3.1. 3.1.),die Mg-ATPase (E.C. 3.6.1.3.)und die Leucinaminopeptidase (E.C. 3.4.11.1.) bevorzugt am Gallepol lokalisiert (153), über ihre Funktion besteht aber keine Klarheit. Dagegen ist sowohl nach histochemischen (7,77) als auch nach biochemischen Befunden (106) eine NaK-ATPase (E.C. 3.6.1.3.) an der basolateralen Seite der Hepatocyten lokalisiert, die für die Aufrechterhaltung eines in die Zelle gerichteten Natriumgradienten sorgt.

Das zusammen mit Gallensäuren und anderen Anionen aus dem Blut in die Zelle einströmende Natrium (99,110) wird von der NaK-ATPase im Austausch gegen Kalium wieder nach außen gepumpt. Sie sorgt damit für einen kontinuierlichen Influx von Anionen; andererseits ist die hohe extrazelluläre Natriumkonzentration möglicherweise Triebkraft für einen Ausstrom von Wasser aus den Gallekanälchen via tight junctions, was wiederum eine Konzentrierung der Gallebestandteile im Canaliculuslumen zur Folge hat. Ein derartiger "paracellulärer Fluß" wird seit einiger Zeit diskutiert (11,12,13,57,58), wobei über die Richtung des Flusses und die Art der transportierten Stoffe keine Einigkeit besteht.

Um die derzeit gängigen Theorien über die Gallebildung und -sekretion zusammenzufassen, sollen die wichtigsten Gesichts-

punkte in einem hypothetischen Schema (Abb.1) dargestellt werden.

Abb.1: Mechanismen der Gallebildung

Organische Anionen (A) und Gallensäuren (B) werden an der Sinusoidalmembran (SM) über getrennte Carrier im Co-Transport mit Natrium (Na^+) in die Zelle aufgenommen. Spezielle Bindungsproteine (L=Ligandin, Al=Albumin) verringern die freie intrazelluläre Konzentration. Am transzellulären Transport sind wahrscheinlich Vesikel und kontraktile Elemente beteiligt (mf = Mikrofilamente, mt=Mikrotubuli). Zur Sekretion des Cholesterins (C) sind definierte Mengen Phospholipide (PL) und Gallensäuren (B) nötig. Anionen und Gallensäuren werden aktiv über die canaliculäre Membran (CM) transportiert, Wasser und darin gelöste Stoffe strömen passiv nach. Eine an der Lateralmembran (LM) lokalisierte NaK-ATPase sort für die Aufrechterhaltung eines einwärts gerichteten Natriumgradienten.

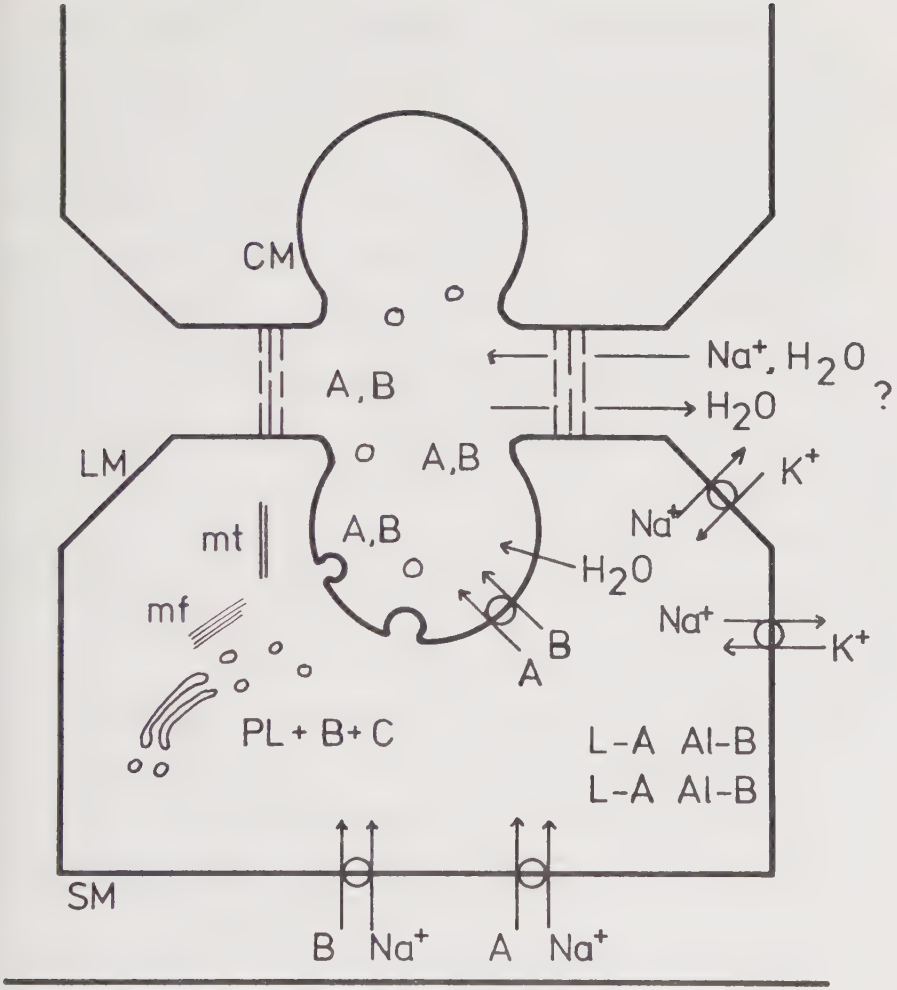


Abb.1: Mechanismen der Gallebildung

1.3. Störungen des Galleflusses: Cholestase

1.3.1. Definition und Erscheinungsbild

Im Sinne des Wortes bedeutet Cholestase Stillstand (Stase) des Galleflusses. Die auffälligste Ursache für Cholestase ist ein Verschluß der abführenden Gallewege, z.B. durch Gallensteine, Tumoren oder in Folge entzündlicher Prozesse, was zu einem Aufstau der Galleflüssigkeit bis in die Gallekanälchen und die Hepatocyten selbst führt. Dieses Phänomen wird als extrahepatische Cholestase bezeichnet (103). Nun werden aber auch Symptome der Cholestase ohne sichtbare Verstopfung der Gallewege beobachtet. Diese intrahepatische Cholestase (103) ist vor allem im Zusammenhang mit dem Gebrauch von Medikamenten bedeutsam. Bei einer Reihe von Arzneistoffen tritt als Nebenwirkung eine intrahepatische Cholestase auf. Hier sind unter anderen folgende zu nennen: Alkaloide wie Colchicin, Vinblastin und Vincristin, die als Cytostatika in der Tumortherapie eingesetzt werden (Übersicht in Ref. 107), synthetische Östrogene, vor allem Äthinylöstradiol, die Bestandteile von oralen Kontrazeptiva sind bzw. zur Therapie von Prostatatumoren verwendet werden (35,66) und Psychopharmaka vom Typ des Chlorpromazins (18,119). Aber auch durch Monohydroxygallensäuren wie Lithocholsäure kann im Tierexperiment eine intrahepatische Cholestase erzeugt werden (15,56).

Im strukturellen, klinischen und biochemischen Erscheinungsbild sind die beiden Formen der Cholestase meist nicht zu unterscheiden. Das auffälligste ultrastrukturelle Merkmal, das in fast allen Fällen auftritt, ist eine unspezifische Dilatation der Gallekanälchen unter Verlust der Mikrovilli und der

Glycocalix und eine Verdichtung des Ectoplasmas (26,56). Intrazelluläre Organellen wie Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien können in unterschiedlichem Maße und abhängig von der Art der Cholestase betroffen sein (105). Unklar ist, ob die ultrastrukturellen Veränderungen primäre Ursachen oder Folgeerscheinungen auf Grund eines beeinträchtigten Zellstoffwechsels sind. Allerdings lassen sich aus dem feinstrukturellen Bild Rückschlüsse auf die funktionelle Störung der Zelle schließen. So deutet die Veränderung des Gallepols auf einen veränderten Transport in den Canaliculus hin; das glatte Endoplasmatische Retikulum ist hypertrophiert, was eine gestörte Funktion dieses Kompartiments vermuten läßt. Davon kann die Lipidsynthese ebenso wie die Biotransformation von Fremdstoffen betroffen sein. Durch die Schädigung der Mitochondrien könnte der Energiestoffwechsel der Hepatocyten beeinflußt werden und so fort.

Durch den gehemmten Gallefluß kommt es zur Kumulation zelltoxischer Substanzen in den Hepatocyten. Eine Folge davon ist die Schädigung der Plasmamembran und ein Übertreten von Gallebestandteilen ins Blut. Sie können zum Teil zur Diagnose von Cholestase herangezogen werden (45). Das Auftreten von konjugiertem Bilirubin im Serum ist ein solcher klinischer Parameter (129), weiterhin ein erhöhter Plasmaspiegel von Alkalischer Phosphatase (AP) gamma-Glutamyltranspeptidase (g-GT, E.C. 2.3.2.2.) und der Transaminasen GOT (E.C. 2.6.1.1.) und GPT (E.C. 2.6.1.2.) (123,131). Ein wichtiges Maß ist die Geschwindigkeit, mit der injiziertes BSP aus dem Blut extrahiert wird (BSP-clearance) (67,133). Die Verschiebung des Verhältnisses von Cholesterin zu Phospholipiden, eine Erhöhung des Gesamtlipidspiegels (83) und das Erscheinen des abnormalen Lipo-

proteins LP-X im Blut (72,82,134) sind Ausdruck eines veränderten Lipidmetabolismus. Intrazellulär angehäufte Gallensäuren gelangen als Sulfate oder Glucuronide ins Blut und können so über die Niere ausgeschieden werden (81,143).

Gallefluß: ↓
BSP-clearance: ↓
Serum-Bilirubin: ↑
Serum-Lipide: ↑
Serum-Gallensäuren: ↑
Serum-LP-X: ↑
Serum-Enzyme (AP, g-GT, GPT, GOT): ↑

Tabelle 1: Klinische Indikatoren der Cholestase

1.3.2. Experimentell erzeugte Cholestase

1.3.2.1. Ligatur des ductus choledochus

Die älteste und wohl am häufigsten angewandte Methode zur experimentellen Erzeugung von Cholestase in Versuchstieren ist das Abbinden des Hauptgalleganges (ductus choledochus). Damit wird der Gallefluß auf Null reduziert und ein Rückstau biliärer Substanzen in allen Teilen des Galleapparates, einschließlich der Hepatocyten, hervorgerufen. Mit Hilfe dieser Methode wurden grundlegende Erscheinungen der extrahepatischen Cholestase aufgeklärt. Das gilt für die Änderung der Enzymmuster in Blut und Leberhomogenat bzw. an isolierten Leberzellmembranen (28,55,123), des Lipidspiegels im Serum (83), für das Auftreten von abnormen Gallensäuren (49) und des LP-X im Serum (72,82) und insbesondere für die feinstrukturellen Ver-

änderungen der Hepatocyten (25,123,149).

Das Problem der intrahepatischen Cholestase kann mit dieser Methode jedoch nicht angegangen werden, weil die Cholestase total ist und weil Ursache und Folgeerscheinungen sich überlagern, sodaß die auftretenden Symptome nicht eindeutig einer Funktionsstörung zugeordnet werden können. Per definitionem ist aber bei einer intrahepatischen Cholestase alleine der parenchymale Anteil der Leber, also die Hepatocyten, betroffen, während nach Ligation des Galleganges auch die abführenden Gallewege mit ihren Epithelien einbezogen sind.

Um Mechanismen der intrahepatischen Cholestase, die wie erwähnt auf Störungen des Hepatocytenstoffwechsels beruhen, zu untersuchen, wurden verschiedene cholestatisch wirksame Agenzien im Tierversuch angewendet. Die meisten Ergebnisse wurden dabei an der isoliert oder in situ perfundierten Leber, aber auch durch die Untersuchung von Zellkompartimenten wie z.B. isolierter Zellmembranen, erzielt.

1.3.2.2. Taurolithocholsäure

Taurolithocholsäure (TLC) kommt unter physiologischen Bedingungen in sehr geringen Mengen, in der Cholestase jedoch vermehrt in der Leber vor (104). Durch die Tätigkeit der Darmflora entsteht sie unter Dehydroxylierung der Chenodesoxycholsäure am C-Atom 7 (vergl. Abb. 2, S.17) und unterliegt, wie alle Gallensäuren, dem enterohepatischen Kreislauf. In höheren Konzentrationen kann mit TLC bereits nach einmaliger Gabe eine schwere intrahepatische Cholestase erzeugt werden (56,67,88,89). Über die Mechanismen ihrer Entstehung sind auf Grund experimenteller Ergebnisse verschiedene Theorien aufge-

stellt worden. Kakis und Yousef (64) fanden einen stark erhöhten Gehalt an Cholesterin in der Canaliculusmembran. Infolgedessen mag es zu einer Herabsetzung der Membranfluidität und zu veränderten Transportleistungen kommen. Desweiteren wurde gefunden, daß nach Gabe von TLC der Enzymgehalt der Gallekanälchenmembran herabgesetzt ist (111,139). Dafür wird der Detergenscharakter der Taurolithocholsäure verantwortlich gemacht, wie auch für eine Inaktivierung des Cytochrom P-450-Systems der Hepatocyten, was aus in vitro-Versuchen bekannt ist (123).

Unter den ultrasturkturellen Veränderungen der Hepatocyten ist insbesondere eine charakteristische lamelläre Auffaltung der canaliculären Membran hervorzuheben, die das gesamte Lumen des Gallekanälchens ausfüllen kann und mit einer Verdichtung des pericanaliculären Plasmas einhergeht (88). Dieser Befund und die biochemischen Messungen an isolierten Gallemembranfraktionen (63,64) legen die Vermutung nahe, daß TLC eine direkte Wirkung auf die Membran des Gallekanälchens ausübt.

1.3.2.3. Äthinylöstradiol

Bei Frauen, die über längere Zeit orale Kontrazeptiva einnahmen und bei Männern, die mit Östrogenen gegen Prostatatumore behandelt wurden, trat in einigen Fällen Cholestase auf (35, 112). Das führte zur systematischen Untersuchung von Östrogenen, vor allem des Äthinylöstradiols. Als Versuchstiere dienten meist Ratten, denen man eine nach außen führende Kanüle in den ductus choledochus(Gallefistel)eingesetzt hatte, um so eine kontinuierliche Entnahme von Galleflüssigkeit zu ermöglichen. Als wesentlichste Befunde aus diesen Versuchen sind zu

nennen: die Reduktion des gallensäureunabhängigen Galleflusses (66), die wohl auf eine Herabsetzung der NaK-ATPase-Aktivität zurückzuführen ist (24) und die veränderte Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin, vor allem die verminderte Hydroxylierungskapazität des glatten ER (112).

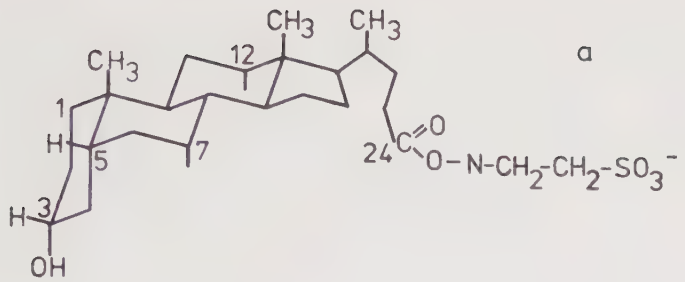
1.3.2.4. Alkaloide

Einige Alkaloide, die als Mitosehemmstoffe in der Tumortherapie eingesetzt werden, haben starke cholestatische Wirkungen. Dazu gehören die Vincaalkaloide Vinblastin, Vincristin und Colchicin. Wie die Pilzalkaloide Cytochalasin B und Phalloidin haben sie die Eigenschaft, kontraktile Elemente des Cytoskeletts, die vermutlich auch am intrazellulären Transport beteiligt sind, zu inaktivieren, wobei die beiden Pilzalkaloide auf die Mikrofilamente (34) und die Vincaalkaloide auf die Mikrotubuli wirken (Übersicht in Ref. 107).

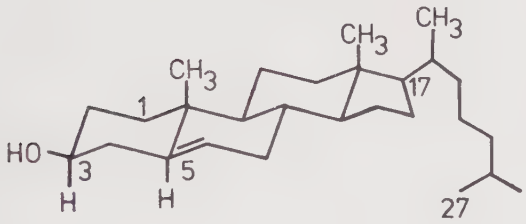
Am Gallepol sind besonders viele Mikrofilamente konzentriert, die das sogenannte "pericanaliculäre Netz" bilden (95) und für die Aufrechterhaltung eines "canaliculären Tonus" sorgen (101), der wahrscheinlich für die Gallesekreton eine Rolle spielt. Von Oshio und Philipps (98) wird sogar eine rythmische Kontraktion des Gallekanälchens beschrieben. Durch die Zerstörung des Mikrofilamentsystems tritt zusammen mit einer Dilatation des Gallekanälchens eine Verdichtung des pericanaliculären Plasmas auf (101); es erscheint eine wenig strukturierte, unregelmäßig granulierte Zone, die den Canaliculus umgibt und der intrazelluläre Transport von Gallensäuren (29) wird gestört.

1.3.2.5. Chlorpromazin

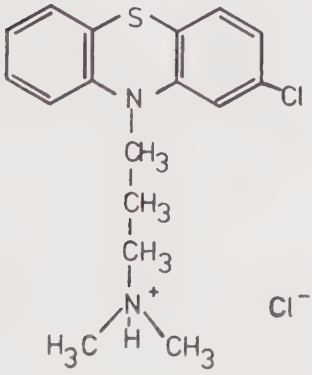
Chlorpromazin (CPZ), ein häufig verwendetes Psychopharmakon vom Phenothiazintyp (54), führt bei 1-2% der behandelten Personen zu Cholestase. Auf Grund seiner Struktur (siehe Abb. 2 c, S.17) ist es in der Lage, mit anionischen Verbindungen wie Gallensäuren und Phospholipiden unlösliche Komplexe zu bilden (18) und in biologischen Membranen zu intercalieren (137). Systematische Untersuchungen haben gezeigt, daß bereits kurze Zeit nach Chlorpromazinapplikation eine Reduktion des Galleflusses (119) und schwerwiegende ultrastrukturelle Veränderungen der Leber zu beobachten sind (54). Eine dosisabhängige Herabsetzung der NaK-ATPase-Aktivität und der Membranfluidität werden auf eine direkte Interaktion des Chlorpromazins bzw. seiner Metabolite mit der Plasmamembran zurückgeführt (65,121). Neuere Untersuchungen an isolierten Rattenhepatocyten ergaben, daß Chlorpromazin bereits in sehr niedrigen Konzentrationen eine allgemeine Permeabilitätserhöhung der Plasmamembran bewirkt (147).



a



b



c

Abb.2: Strukturformeln von Taurolithocholat (a), Cholesterin (b) und Chlorpromazin-Hydrochlorid (c)

1.3.3. Theorien über Ursachen der intrahepatischen Cholestase

Die Wirkungsweise der oben beschriebenen Agenzien auf die Ultrastruktur und den Stoffwechsel der Hepatocyten legen verschiedene Hypothesen über die Entstehung der intrahepatischen Cholestase nahe. Zusammenfassend sollen sie hier noch einmal stichpunktartig aufgeführt werden.

- Die chemische Zusammensetzung der canaliculären Membran ist gestört. Veränderte Fluidität und Permeabilität sowie ein abnormaler Proteingehalt führen zu einer Verminderung der Transportleistung.
- Die NaK-ATPase, die für die Aufrechterhaltung des gallensäureunabhängigen Flusses sorgt, wird spezifisch gehemmt.
- Durch die Zerstörung der kontraktilen Elemente des Cytoskeletts wird der intrazelluläre Transport der Gallebestandteile unterbrochen und der "canaliculäre Tonus" zerstört.
- Durch eine veränderte Gallensäure- und Lipidsynthese wird die Balance zwischen Phospholipid-,Gallensäuren- und Cholesterinkonzentration gestört. Die Anhäufung von amphiphilen Lipiden führt zur Schädigung der zellulären Membranen.

Obwohl die primären Ursachen der Cholestase nur schwer von den Folgeerscheinungen zu trennen sind, liegen sie doch am ehesten in einem unphysiologischen Lipidstoffwechsel, der die meisten der beobachteten zellulären, biochemischen und klinischen Veränderungen erklären kann.

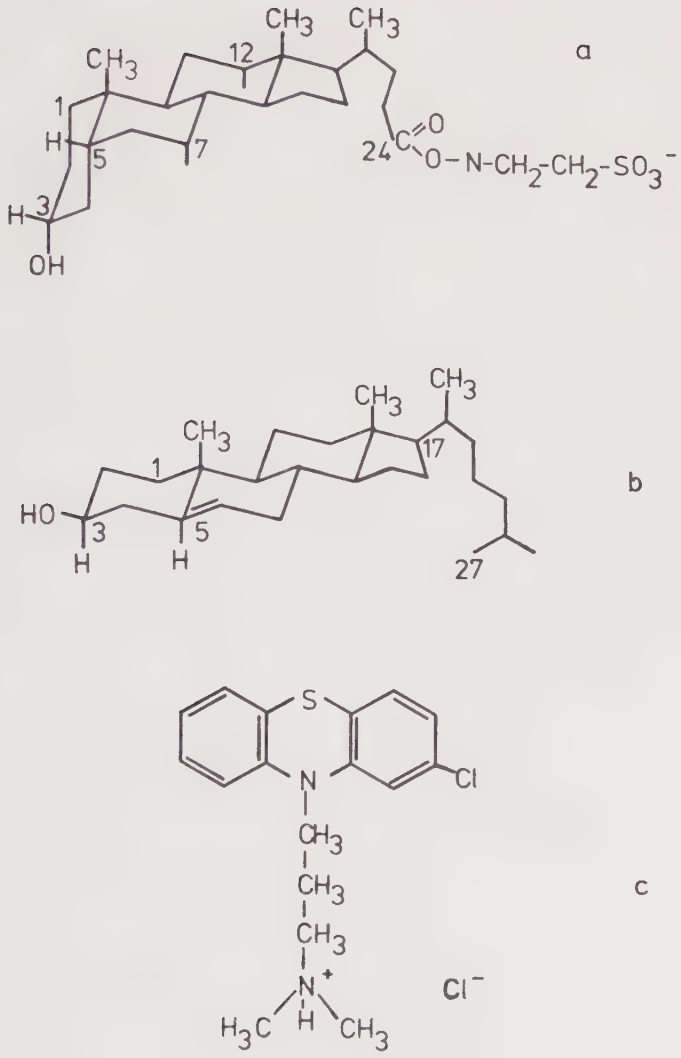


Abb.2: Strukturformeln von Taurolithocholat (a), Cholesterin (b) und Chlorpromazin-Hydrochlorid (c)

1.3.3. Theorien über Ursachen der intrahepatischen Cholestase

Die Wirkungsweise der oben beschriebenen Agenzien auf die Ultrastruktur und den Stoffwechsel der Hepatocyten legen verschiedene Hypothesen über die Entstehung der intrahepatischen Cholestase nahe. Zusammenfassend sollen sie hier noch einmal stichpunktartig aufgeführt werden.

- Die chemische Zusammensetzung der canaliculären Membran ist gestört. Veränderte Fluidität und Permeabilität sowie ein abnormaler Proteingehalt führen zu einer Verminderung der Transportleistung.
- Die NaK-ATPase, die für die Aufrechterhaltung des gallensäureunabhängigen Flusses sorgt, wird spezifisch gehemmt.
- Durch die Zerstörung der kontraktilen Elemente des Cytoskeletts wird der intrazelluläre Transport der Gallebestandteile unterbrochen und der "canaliculäre Tonus" zerstört.
- Durch eine veränderte Gallensäure- und Lipidsynthese wird die Balance zwischen Phospholipid-,Gallensäuren- und Cholesterinkonzentration gestört. Die Anhäufung von amphiphilen Lipiden führt zur Schädigung der zellulären Membranen.

Obwohl die primären Ursachen der Cholestase nur schwer von den Folgeerscheinungen zu trennen sind, liegen sie doch am ehesten in einem unphysiologischen Lipidstoffwechsel, der die meisten der beobachteten zellulären, biochemischen und klinischen Veränderungen erklären kann.

1.4. Die Hepatocytenkultur als experimentelles System

In der Mitte der 70er Jahre erschienen die ersten Arbeiten über Primärkulturen adulter Rattenhepatocyten. Diese und die folgenden Veröffentlichungen hatten im wesentlichen zum Ziel, die Fähigkeit der kultivierten Zellen zu parenchymspezifischen Leistungen und ihre utrastrukturelle Integrität nachzuweisen. Für eine Übersicht über diese Arbeiten sei auf die Dissertation von Gebhardt (39) verwiesen. Es darf heute als sicher gelten, daß Kulturen von Parenchymzellen der Leber als Modellsystem zur Aufklärung des hepatischen Stoffwechsels und seiner Regulation herangezogen werden können. Einer ihrer Vorteile liegt darin, daß der Stoffwechsel des Leberparenchyms ohne die Interferenz mit anderen Zellen des Organs - wie in der perfundierten Leber - oder die hormonelle und innervatorische Beeinflussung des Gesamtorganismus - wie im Ganztier - untersucht werden kann.

Ein entscheidender Unterschied im Vergleich zum intakten Organ ist jedoch das Fehlen eines normalen Kreislaufes, der u.a. den Abtransport von Stoffwechselabfallprodukten übernimmt. Des weiteren ist die Ausbildung eines normalen Gallegefäßsystems, auch eines enterohepatischen Kreislaufs in der Kultur nicht möglich. Allerdings wird in vielen Publikationen die Ausbildung gallekanälchenartiger Strukturen zwischen benachbarten Zellen hervorgehoben (19,85,122,150). Diese strukturelle Rekonstitution besagt jedoch nichts über die funktionelle Integrität der Kanälchen, die durch eine aktive Sekretion von biliären Substanzen gekennzeichnet sein müßte.

In neueren Publikationen unserer Arbeitsgruppe wurde dieser Komplex näher untersucht und mit der Frage nach den Mechanismen, die der Ausbildung eines biliären Pols zugrunde liegen, verknüpft.

Aktivitätsänderungen membranständiger Enzyme über den Kultivierungszeitraum wie auch ihre ultrastrukturelle Verteilung lassen auf einen grundlegenden Umbau der Plasmamembran schließen (61). Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, daß die Neuausbildung von tight junctions, die innerhalb von sogenannten tight junction-Formationszonen um einen entstehenden Canaliculus herum verläuft, mit massiven Verschiebungen des Membrancholesterins einhergeht (44,117).

Die Sekretion von Fluorescein in die Galle, wie sie von Hanzon aus in vivo-Versuchen beschrieben ist (50), funktioniert auch in der Hepatocytenkultur, und zwar mit den Merkmalen eines aktiven Transports (42). Dieser Befund wird auch von Barth und Schwarz bestätigt (6). Darüberhinaus konnte der spezifische Transport von fluoreszenzmarkiertem IgA zu den Gallekanälchen nachgewiesen werden (40).

Vor diesem Hintergrund darf angenommen werden, daß die Gallekanälchen, wie sie in der Kultur auftreten, neben ihrer intakten Struktur auch zu funktionellen Leistungen befähigt sind. Damit scheint dieses System zur Untersuchung von Mechanismen des biliären Transports und seiner Störungen, der Cholestase, geeignet zu sein.

1.5. Ultrastruktureller Nachweis von Cholesterin mittels Filipin

Durch die Entwicklung der Elektronenmikroskopie und entsprechender Präparationsmethoden für biologisches Material sind in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte in der Aufklärung biologischer Strukturen gelungen. Unsere heutigen Vorstellungen über die Feinstrukturen und die Funktion von Zellen und Zellorganellen beruhen wesentlich auf diesen Leistungen. Zur Aufklärung von Membranstrukturen *in situ* hat dabei die Anwendung der Gefrierbruchtechnik in besonderem Maße beigetragen. (Eine Übersicht darüber gibt Ref. 115). Mit neuerlich eingeführten cytochemischen Methoden, die eine spezifische Lokalisierung von Membranbestandteilen ermöglichen, lassen sich zusätzliche Erkenntnisse gewinnen (135).

In der vorliegenden Arbeit wurde Filipin als cytochemischer Marker für Membrancholesterin angewendet. Dieses Polyenantibiotikum (Formel in Abb.3, S. 22) bewirkt Permeabilitätsveränderungen in biologischen sowie in artifiziellen Membranen, die auf eine spezifische Wechselwirkung mit Cholesterin zurückzuführen sind (68,94). Kinsky et al. (69) und nachfolgend andere Autoren (30,96,117,118,136,148) machten sich diese Eigenschaft zunutze, um Cholesterin in biologischen Membranen verschiedener Herkunft zu lokalisieren.

Filipin-Cholesterin-Komplex erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als charakteristische Membranläsionen. Im Gefrierbruch sind sie als 25 nm große Erhebungen auf der P-Seite bzw. Vertiefungen auf der E-Seite und im Ultradünnschnitt als Korrugationen der betroffenen Membranen zu erkennen. Mit

Hilfe des Filipins und anderer cytochemischer Marker für Cholesterin konnten wesentliche Erkenntnisse über die Mikroheterogenität biologischer Membranen gewonnen werden.

Bezüglich der Gefrierbruchtechnik und -nomenklatur sei auf die entsprechende Literatur verwiesen (16 und Lehrbücher der Elektronenmikroskopie).

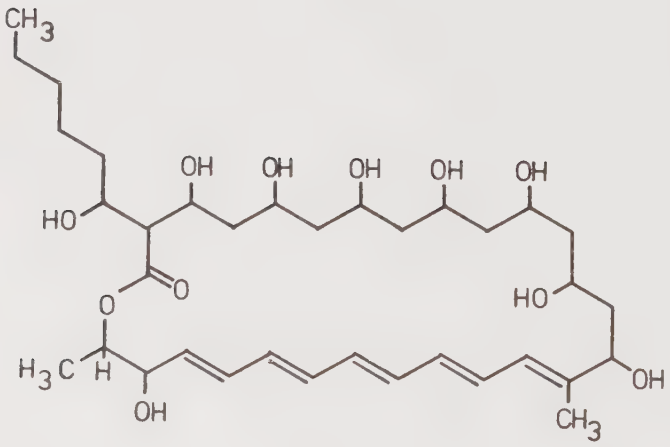


Abb. 3: Strukturformel von Filipin

1.6. Problemstellungen der vorliegenden Arbeit

Die Idee zu der vorliegenden Arbeit entwickelte sich aus der Beobachtung, daß Gallekanälchen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Kultivierungsbedingungen *de novo* ausgebildet werden (60). Dies legte die Aufgabe nahe, auch deren funktionellen Status näher zu charakterisieren. Dazu sollten im wesentlichen zwei Versuchsansätze dienen, die beide auf die Untersuchung der biliären Polarität in den kultivierten Hepatocyten abzielten.

Einmal war die Frage zu klären, ob die Kulturen zur Untersuchung der biliären Sekretion und zugrunde liegender Mechanismen herangezogen werden können. Erste Hinweise dafür, daß eine Sekretion in die Gallekanälchen stattfindet, lieferte eine Arbeit von Lambiotte (75), der in Kulturen von foetalen Hepatocyten eine Anreicherung von Fluorescein in den interzellulären Strukturen beschrieb. Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, daß Fluorescein bei der Bestrahlung mit UV-Licht rasch zerstört wird und dessen Fluoreszenz schlecht auf Schwarz-Weiß-Film aufgenommen werden kann. Es mußte deshalb nach einem stabileren Fluoreszenzfarbstoff gesucht werden, der sich für die Untersuchung des Anionentransports eignete.

Zum zweiten sollten die Kulturen mit Hilfe der beiden cholestatisch wirksamen Substanzen Taurolithocholat und Chlorpromazin in einen eindeutig cholestatischen Zustand versetzt werden, wobei die Untersuchung der Ultrastruktur der Hepatocyten als Kriterium herangezogen werden sollte. Das Ziel dieser Versuche bestand darin, durch eine gezielte Störung der Gallesekretion Aufschlüsse über die primären Ursachen dieser Störung und über Mechanismen der Sekretion selbst zu erhalten.

Besonderes Gewicht wurde auf die Verteilung von Membrancholesterin gelegt, das mit Hilfe von Filipin *in situ* lokalisiert werden kann. Den Hintergrund dazu lieferten biochemische Messungen (63), auf Grund derer eine erhöhte Inkorporation von Cholesterin für die charakteristischen, lamellären Transformationen der Gallekanälchenmembran in der TLC-induzierten Cholestase verantwortlich gemacht wurden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Es wurden männliche Ratten der Rasse Spraque-Dawley mit einem Körpergewicht von 250-300 g verwendet. Die Tiere erhielten Alma^{R}-Futter (Botzenhardt, Kempten) und Wasser ad libitum.

2.2. Geräte

Sterile Werkbank "Laminar Air Flow" (Horizontalstrom)	Centronic (Berlin)
Sterile Werkbank (Vertikalstrom)	Ceag (Bork)
CO_2-Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Tischzentrifuge,Labofuge III	Heraeus-Christ
Autoklav FO/3-Z1	Fedegari-Pavia (Italien)
Membranfiltrationsgerät	Sartorius (Göttingen)
Sonifier B-12	Branson Sonic Power Comp. (Danbury, USA)
Inverses Mikroskop (Diavert) mit Phasenkontrasteinrichtung und Fluoreszenzeinrichtung (Ploemopak 2.2; Filterblock I-2) und Hochdruck-Quecksilberlampe	Leitz (Wetzlar)
Elektronenmikroskop EM 109	Zeiss (Oberkochen)
Pyramitom	LKB (Bromma,Schweden)
Ultramikrotom, Ultrotome 4800	"
Knifemaker	"
Diamantmesser WR	Diatome AG (Biel,Schweiz)
Pumpe (Minipuls II)	Gilson Medical Electronics (Villiers-le-Bel, Frankreich)
Minishaker,Modell Kühner	Braun (Melsungen)

2.3. Verbrauchsmittel

2.3.1. Materialien

Braunülen	Braun (Melsungen)
Infusionsgerät R 76 Rekord	Pfrimmer (Erlangen)
Plastik-Petrischalen	Greiner (Nürtingen)
Gewebekulturschalen	"
Plastik-Einmalreagenzgläser	"
Polyamid-Maschengewebe (100, 200 µm)	Schweizerische Seidengazefabrik (Waldkirch)
Membranfilter	Sartorius (Göttingen) oder Schleicher und Schüll (Dassel)
Siliconschläuche	Wacker (München)
Leergelatinekapseln 0,36	Pohl-Boskamp (Hohenlockstedt)
Beem-Kapseln Gr. 3	Plannet (Marburg)
Präparatkapseln perforiert	"
Kupfernetze (200 mesh)	Veco (Solingen)
Dentalwachs (Gebdi Modellierwachs)	Gebr. Ditzel (Meckesheim
Molekularsieb 3 A, Perlform 2 mm	Merck (Darmstadt)
Kodak Tri-X-Pan 135-36 (für Fluoreszenzfotografie)	Eastman Kodak Comp. (Rochester, USA)
Agfa Ortho 25-120 (für Elektronenmikroskopie)	Agfa-Gevaert (Leverkusen)

2.3.2. Chemikalien, Enzyme, Hormone

Dimethylarsinsäure-Natriumsalz (Natriumcacodylat)	Merck (Darmstadt)
Aktivkohle	"
Uranylacetat	"
Phenobarbital	"
Glycin	"
L-Phenylalanin	"
L-Glutaminsäure	"
L-Arginin	"
L-Lysinmonohydrochlorid	"
Cholinchlorid	"
Benzylamin	"

Methylamin-Hydrochlorid	EGA-Chemie (Steinheim)
Fluoresceinamin Isomer II	"
5,6-Carboxyfluorescein	Eastmann-Kodak (Rochester, USA)
Ouabain	Serva (Heidelberg) oder Sigma (München)
Hepes	"
Dexamethason	"
Insulin	"
Glucagon	"
Trijodthyronin	"
Collagenase Typ I	"
Glutardialdehyd, speziell gereinigt für die Elektronenmikroskopie	"
Trypsin	Boehringer (Mannheim)
Trypsin-Inhibitor	"
Bleicitrat	Serva (Heidelberg)
Antibiotica	"
Fluorescein-Natriumsalz	"
Fluoresceinisothiocyanat Isomer I	"
Trypanblau	Flow Laboratories (Bonn)
Bacto Agar	Difco (Detroit, USA)
Osmiumtetroxid	Baker (Deventer, Holland)
Pioloform	Wacker (München)
Kälberserum	Paesel (Frankfurt) oder Serva (Heidelberg)
Albumin (Rinderserum) Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Propylenoxid	"
Epikote 812	"
Härter DBA	"
Härter MNA	"
Beschleuniger DMP-30	"
Filipin	Upjohn (Kalamazoo, USA)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firmen Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Sigma (München) oder Serva (Heidelberg)

2.4. Lösungen und Kulturmedien, Isolierung und Kultivierung der Hepatocyten

Alle Lösungen und Medien für die Isolierung und Kultivierung der Hepatocyten wurden in unserem Laboratorium hergestellt. Ihre Zusammensetzung und die Methodik ihrer Herstellung wurde in verschiedenen früheren Arbeiten ausführlich angegeben (39, 43,84,127). Detaillierte Beschreibungen zur Technik der Hepatocytenisolierung und -kultivierung finden sich ebenfalls in diesen Arbeiten.

2.5. Aufarbeitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie

In den ersten Experimenten wurden die Zellen entsprechend der in meiner Diplomarbeit beschriebenen Methode für die Elektronenmikroskopie vorbereitet (60). Später eingeführte Techniken sollen nachfolgend aufgeführt werden.

2.5.1. Einbettung der Zellen als Suspension

Die Einbettung in Agar (vergl. Ref. 60) schließt das Vermischen der Zellen mit heißer (46°C) Agarlösung ein. Da eine Schädigung des Materials durch eine solche Behandlung nicht auszuschließen ist, sollte dieser Schritt umgangen werden. Darüberhinaus wurde eine Konzentrierung des Zellmaterials an der Präparatspitze angestrebt. Die Zellen wurden also nach der Fixierung mit Glutaraldehyd zusammengekratzt und in Eppendorfcups überführt. Die Nachfixierung mit Osmiumtetroxid und die Entwässerung erfolgten in diesen Gefäßen, wobei die Lösungen nach Zentrifugation mittels einer Pasteurpipette abgesaugt wurden. Die Zeiten der einzelnen Präparationsschritte wurden gegenüber früher (60) um ca. 30% verkürzt, da die so

behandelten Proben schneller äquilibrieren als Agarblöckchen. Nach dem letzten Eponwechsel wurden die Zellen in wenig Eponmischung B suspendiert, mit einer Eppendorfpipette in Beem-Kapseln transferiert und diese nach erneuter Zentrifugation mit Epon aufgefüllt.

2.5.2. Ablösen der Zellen mit Trypsin

Es hatte sich gezeigt, daß das Abkratzen der Zellen mit einem Gummischaber oft zur mechanischen Zerstörung der Ultrastruktur führte. Löst man dagegen die Zellen mit Trypsin vom Substratum ab, so bleiben sie strukturell vollständig intakt. Allerdings wurde im Verlaufe dieser Versuche festgestellt, daß sich nur einfache, mit Kollagen beschichtete Kulturschalen für diese Behandlung eignen, nicht jedoch Gewebekulturschalen, deren Oberfläche speziell behandelt ist, um eine bessere Anheftung von Zellen zu ermöglichen. Die einzelnen Schritte der Trypsinierung verlaufen folgendermaßen:

- Kulturmedium abgießen und Zellen mit warmer, 0,9%iger Saline abspülen
- Schalen auf einem 37°C-warmen Wasserbad schwimmend vorinkubieren
- Trypsinlösung (1mg/ml in 0,9%iger Saline) auf die Zellen pipettieren (2 ml pro halbe Schale, Ø 9 cm)
- nach 2 Minuten doppelte Menge Trypsin-Inhibitor zugeben und die abgelösten Zellen in eiskalten, 2,5%igen, gepufferten Glutaraldehyd überführen.

Eine geschlossene Monolayer löst sich auf diese Weise als Ganzes ab; durch vorsichtiges Schütteln während der Inkubation

mit Trypsin kann sie in mehr oder weniger große Bruchstücke zerlegt werden.

Das Trypsin wird in einem kleinen Volumen 0,01 N HCL vorgelöst und der pH-Wert nach Zugabe der Saline auf 7 eingestellt. Der Trypsin-Inhibitor läßt sich zu 20 mg/ml lösen, sodaß durch Zugabe von 1/10 des Volumens der Trypsinlösung die doppelte Menge Inhibitor in den Inkubationsansatz eingebracht werden kann.

Die durch Trypsinierung abgelöste Monolayer kontrahiert zu mehr oder weniger dicken Zellklumpen, die in perforierte Präparatkapseln überführt und bis zur Einbettung in Beem-Kapseln darin belassen werden können.

2.5.3. Aufbereitung der Kulturen für den Gefrierbruch

Nach Abgießen des Kulturmediums wurde die Monolayer mit kalter, 0,9%iger Kochsalzlösung gespült und mit 2,5%igem Glutaraldehyd in Isolationsmedium (vergl. Ref. 84) 1-2 Stunden lang fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Gummischaber zusammengekratzt und in Isolationsmedium zur Weiterverarbeitung zu Herrn Dr. Robenek nach Münster geschickt, der die Gefrierbrüche wie in (117) beschrieben, durchführte. Die Bildauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Robenek.

2.5.4. Filipin-Behandlung

Vorfixierte Zellen wurden mit einer 0,02%igen Lösung von Filipin in Cacodylatpuffer (0,1 M, pH 7,4) über Nacht bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß behandelt. Das Filipin wird in wenig Dimethylformamid (136) bzw. Dimethylsulfoxid (96) vorgelöst und mit Puffer auf die gewünschte Endkonzentration gebracht.

2.6. Behandlung der Kulturen mit Cholestase-Agenzien

2.6.1. Taurolithocholat

Von Taurolithocholat-Natrimsalz (TLC) wurde eine 10 mM Stammlösung in absolutem Äthanol hergestellt und diese dem Kulturmedium direkt zugesetzt. In den meisten Versuchen wurde eine Endkonzentration von 0,1 mM TLC, entsprechend einer 100-fachen Verdünnung, angewendet. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit 1% Äthanol bzw. ohne Äthanol und ohne TLC behandelt worden waren. Kulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und verschieden lange dem Taurolithocholat ausgesetzt und zwar am 1., 3. und 6. Kulturtag für 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6 bzw. 24 Stunden.

2.6.2. Chlorpromazin

Von Chlorpromazinhydrochlorid (CPZ) wurde eine 100-fach konzentrierte Stammlösung in Hank's-Lösung hergestellt, steril filtriert und durch Zugabe entsprechender Mengen zum Kulturmedium auf 0,1, 0,25 und 0,5 mM Endkonzentration verdünnt. In der Regel wurde wiederum mit 0,1 mM CPZ gearbeitet. Die Behandlungen erfolgten am 1., 2., 3. und 4. Kulturtag für 1/2, 1, 2, 5 oder 24 Stunden.

2.7. Fluorescein und Derivate des Fluoresceinisothiocyanats

2.7.1. Fluorescein

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 0,5 mg Fluorescein in 1 ml 0,9%iger Saline gelöst und diese 1:100 mit Kulturmedium verdünnt (20 µl/2ml; Endkonz. 5 µg/ml, entspr. 15 µM). Die Inkubation erfolgte in einem Medium frei von Serum, RSA

und Oleat (90% Grundmedium, 10% Ergänzungsmedium (vergl. Ref. 39)) bei 37°C im Brutschrank unter 95% Luft und 5% CO_2. Für die mikroskopische Untersuchung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 4 mal mit zimmerwarmer Saline gewaschen, um an den Zelloberflächen gebundenen Farbstoff zu entfernen. Die fünfte Waschlösung wurde in den Schalen belassen. Zur Beobachtung der Fluoreszenz wurde ein Leitz Mikroskop mit Fluoreszenzzusatz verwendet (siehe Abschn.2.2., S.25), dessen Anregungswellenlänge bei 450-490 nm und dessen Emissionswellenlänge bei 515 nm liegt. Für mikrofotografische Aufnahmen wurden Kodak Tri-X-Pan-Filme verwendet. Die Belichtungszeit für Fluoreszenzaufnahmen betrug in aller Regel 1 Minute. Es wurde zu jedem Fluoreszenzbild ein korrespondierendes Phasenkontrastbild aufgenommen, um fluoreszierende Strukturen entsprechend identifizieren zu können.

Die Durchführung der Fluoreszenzaufnahmen mußte sehr rasch geschehen, da das Fluoresceinmolekül im Anregungslicht zerstört wird und infolgedessen die Fluoreszenz sehr schnell verblasst. Wenig intensiv leuchtende Zellen und Gallekanälchen konnten deshalb auch schlecht auf Schwarz-Weiß Material fotografiert werden. Diese Tatsache lieferte den eigentlichen Anstoß, nach einem UV-stabilen Farbstoff zu suchen, der dennoch als organisches Anion in die Gallekanälchen transportiert wird.

2.7.2. Derivate des Fluoresceinisothiocyanats

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wird als Fluoreszenzmarker für Proteine verwendet. Es ist als solcher UV-stabil und sollte sich an jedes beliebige Amin, also auch an die Amino-

gruppe von Aminosäuren, koppeln lassen, Dazu wurden 2 mg FITC in reichlich Aceton und Chloroform (Mischung 1:1) vorgelöst, das Lösungsmittel durch Begasen mit Stickstoff entfernt und der Rückstand in 1 ml Aceton aufgenommen. 2 mg Glycin (entsprechend dem 4-fachen molaren Überschuß gegenüber FITC) wurden in 1 ml Kaliumcarbonatpuffer (0,1 M, pH 9,0) gelöst und mit FITC über Nacht bei Zimmertemperatur und unter Lichtabschluß gerührt. Die Reaktion wurde an Hand von Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Als bestes Laufmittel stellte sich ein Gemisch von Chloroform, Methanol und Eisessig im Verhältnis 35:15:5 heraus. Fluorescein und dessen Derivate sind auf Grund ihrer gelben Farbe auf der DC-Platte direkt zu erkennen; die Aminosäuren wurden durch Besprühen mit Ninhydrin sichtbar gemacht.

Außer Glycin wurden die Aminosäuren Phenylalanin, Lysin, Arginin und Glutaminsäure, als nicht geladene Amine Methylamin und Benzylamin jeweils im 4-fachen Überschuß als Kopplungskomponenten eingesetzt. Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Benzyl- bzw. Methylamin und der Kopplungsprodukte wurden wiederum verschiedene Laufmittel erprobt. Obwohl sich die RF-Werte der Kopplungsprodukte nicht wesentlich von dem des FITC unterschieden, ergab auch hier die bereits beschriebene Mischung von Chloroform, Methanol und Eisessig das beste Ergebnis. Zum Sichtbarmachen der Amine nach dem DC-Lauf wurde folgendes Reagenz verwendet:

a) 2% $FeCl_3$ in Wasser

b) 1% Kaliumhexacyanoferrat-III in Wasser

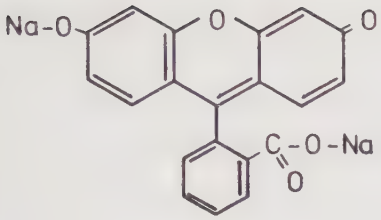
a) und b) werden kurz vor der Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt. Vor dem Besprühen der Platte muß das Laufmittel

vollständig verdampft sein, da sich sonst die DC-Platte als ganzes anfärbt und die Probenpunkte nicht zu identifizieren sind.

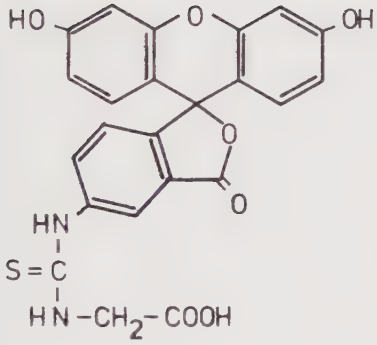
Die Kopplung der Amine bzw. Aminosäuren an das Fluoresceinisothiocyanat ergibt Verbindungen, die als Derivate des Thioharnstoffes aufgefaßt und als solche benannt werden können (vergl. Abb. 4, S.35). Ihre systematischen Namen samt der im folgenden verwendeten Abkürzungen lauten wie folgt:

Kopplungs-komponente	systematischer Name des Kopplungsprodukts	Abkürzung
Glycin	N-Glycyl-N'-Fluoresceinyl-Thioharnstoff	Gly-FITC
Arginin	N-Arginyl-N'- "	Arg-FITC
Lysin	N-Lysyl-N'- "	Lys-FITC
Glutaminsäure	N-Glutamyl-N'- "	Glu-FITC
Phenylalanin	N-Phenylalanyl-N'-"	Phe-FITC
Methylamin	N-Methyl-N'- "	Methylamin-FITC
Benzylamin	N-Benzyl-N'- "	Benzylamin-FITC

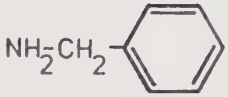
Die Inkubation der Zellkulturen mit den verschiedenen Farbstoffen erfolgte ebenso wie mit Fluorescein (2.7.1.,S.31/32). Es wurden jedoch in der Mehrzahl der Fälle 50 µl des Reaktionsansatzes pro 2ml Medium eingesetzt. Nimmt man einen quantitativen Umsatz bei der Kopplung an, so ergibt sich eine Endkonzentration von 64 µM bei Gly-FITC. Die Molekulargewichte der anderen Derivate weichen von dem des Gly-FITC nur geringfügig ab.



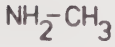
a



b



c



d

Abb.4: Strukturformeln von Na-Fluorescein (a), Gly-FITC (b), Benzylamin (c) und Methylamin (d)

2.8. Hank's-Lösung ohne Natrium

Für die Versuche über die Natrium-Abhängigkeit des Anionentransports wurde der Farbstoff nicht in Medium sondern in einer Hepes-gepufferten Hank's-Lösung angeboten, in der Natriumchlorid durch Cholinchlorid und Di-Natriumhydrogenphosphat durch Di-Kaliumhydrogenphosphat ersetzt worden waren. Der durch K_2HPO_4 eingebrachte Kaliumanteil wurde bei der KCl-Einwaage abgezogen. Nachfolgend ist die genaue Zusammensetzung der Na-freien Hank's-Lösung angegeben.

	Molekulargewicht	Molarität (mM)	Einwaage in g (für 1 l)
Cholinchlorid	139,6	137,0	8
KCl	74,56	5,4	0,4
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	246,48	0,41	0,1
$MgCl \times 6\ H_2O$	203,31	0,49	0,1
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	228,33	0,34	0,076
KH_2PO_4	136,09	0,44	0,06
Hepes	238,3	2	0,477

2.9. Hemmstoffe

2.9.1. Ouabain

Ouabain, ein spezifischer Hemmstoff der NaK-ATPase (33) wurde bis zu einer Konzentration von 1 mM direkt in Kulturmedium gelöst (7,3 mg/10ml) und dieses mit dem Fluoreszenzfarbstoff versetzt. In einigen Fällen wurden die Zellen 1 Stunde lang mit 1 mM Ouabain vorbehandelt und der Fluoreszenzfarbstoff anschließend supplementiert.

2.9.2. Fluoresceinamin

Fluoresceinamin Isomer I (4'-Aminofluorescein) und Isomer II (5' Aminofluorescein) tragen statt der Isothiocyanatgruppe (vergl. Abb. 4, S. 35) eine Aminogruppe; beide Isomere fluorezieren nicht unter den gegebenen Bedingungen. Da ihre Struktur jedoch mit der des Fluoresceins nahezu identisch ist, sollten sie als mögliche kompetitive Inhibitoren des Transports der Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

Aus einer Lösung von 2 mg/ml (entspr. 5,8 mM) in absolutem Äthanol wurden variierende Mengen dem Kulturmedium zugegeben, sodaß die Amine gegenüber dem Gly-FITC in bis zu 6-fachem Überschuß vorlagen.

2.10. Behandlung der Zellen mit Sucroselösung

Durch die Behandlung der Kulturen mit einer hypertonen Sucroselösung können die tight junctions aufgebrochen werden. Im Anschluß an die Inkubation mit Gly-FITC und nach fünfmaligem Waschen mit Saline (vergl. 2.7.1., S.31/32) wurden die Zellen mit einer 1 M Sucroselösung in Hank's-Lösung versetzt und das Auslaufen der Gallekanälchen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

2.11. Stimulierende Agenzien

2.11.1. Hormone

Unter verschiedenen Hormonbedingungen wurde diejenige ausgewählt, die vom lichtmikroskopischen Eindruck her der Ausbildung der Gallekanälchen am förderlichsten war. Die Kombination Glucagon (5×10^{-6}M bzw. 10^{-7}M), Dexamethasen (10^{-6}M)

und Trijodthyronin (T_3; 10^{-6}M bzw. 10^{-7}M) erfüllte diese Bedingung. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit Insulin (2,5 oder 25 U/l) und Dexamethason (10^{-6}M) ausplattiert und beim ersten Wechsel (variierend zwischen 45 Minuten und 4 Stunden) auf ein Medium mit Glucagon, Dexamethason und T_3 umgesetzt.

2.11.2. Phenobarbital

Phenobarbital ist als choleretisches Agens bekannt (32). Es wurde als 100-fach konzentrierte Stammlösung in Hank's-Lösung oder in Wasser angesetzt, steril filtriert und in einer Endkonzentration von 5 mM vom ersten Medienwechsel ab den Kulturen zugesetzt. Die Stammlösung mußte wöchentlich frisch zubereitet werden, da das Phenobarbital nach dieser Zeit aus der Lösung ausfiel.

3. Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse schriftlich dargestellt. Die zugehörigen Fotografien wurden aus technischen Gründen in einem Bildanhang zusammengefaßt.

3.1. Ultrastruktur der kultivierten Hepatocyten

3.1.1. Die Organellen

Im großen und ganzen entspricht die Ultrastruktur der kultivierten Hepatocyten derjenigen der intakten Leber (19,122, 144,150). Durch das Isolierungstrauma und die besonderen Bedingungen in der Kultur ergeben sich jedoch einige Unterschiede.

Zelloberfläche - Plasmamembran

Nach dem Aussäen breiten sich die Zellen auf dem Schalenboden so lange aus, bis sie an eine benachbarte Zelle stoßen. Innerhalb etwa eines Tages ist die Monolayer soweit ausgebildet, daß jede Hepatocyte mit mehreren angrenzenden Zellen Verbindung aufgenommen hat. Im lichtmikroskopischen Bild erscheinen die Zellen dann polygonal (Bild 5). Die Art der Zellkontakte gleicht denen von Parenchymzellen des intakten Organs. In Bild 1, oben links ist ein Desmosom, in Bild 7, unten links sind quergeschnittene tight junctions und in Bild 9 gefriergebrochene tight junctions dargestellt. Gap junctions sind in kultivierten Zellen weitaus seltener als in der Leber (H.Robenek, pers.Mitteilung).

Benachbarte Zellen bilden in der Regel einen 150-200 Å breiten Interzellularspalt (Bild 1, Mitte), der häufig und in unregelmäßigen Abständen von gallekanälchenartigen Strukturen unterbrochen ist (Bild 6, Mitte). Abhängig davon, in welcher Ebene die Monolayer angeschnitten wurde, kann der Interzellularspalt jedoch auch breiter und von Mikrovilli durchsetzt sein (Bild 2, unten), vor allem dann, wenn der Randbereich betroffen ist.

Zellkern

Die Kerne in kultivierten Hepatocyten unterscheiden sich im Aussehen nicht von denen in Parenchymzellen der intakten Leber. Das Chromatin erscheint fein granuliert und entlang der Kernmembran etwas dichter; die Nucleoli sind gut ausgebildet und liegen als stärker elektronendichte Bezirke innerhalb des Chromatins (Bild 3, oben links). Im Querschnitt ist die Kernhülle als Doppelmembran, unterbrochen durch die Kernporen, zu erkennen (Bild 3, oben rechts). Bild 3, unten links, das einen tangential angeschnittenen Kern darstellt, zeigt die Substruktur der Kernporen, die auch im Gefrierbruch als charakteristische Gebilde erscheinen (Bild 3, unten rechts).

Mitochondrien

Die Mitochondrien sind unregelmäßig über die Zellen verteilt; in manchen Bezirken liegen sie dicht gepackt, während in anderen Regionen des Cytoplasmas keine zu finden sind (Bild 1, Mitte). Sie treten sehr oft zusammen mit rauhem ER auf. In Form, Integrität der Membranen, Auftreten von Granula und Ausbildung der Cristae unterscheiden sie sich nicht von denen

der Ganzleber (Bild 1, oben Mitte und oben rechts). Allerdings erscheinen die Cristae in manchen Fällen leicht dilatiert, was wahrscheinlich auf die Kulturbedingungen zurückzuführen ist.

Rauhes Endoplasmatisches Retikulum

Übereinstimmend mit Chapman et al. (19) findet sich in vielen Fällen rER vergesellschaftet mit Mitochondrien, wobei diese oft fast vollständig von rER umkreist sind (Bild 1, Mitte und oben Mitte). Neben diesem perimitochondrialen rER treten aber auch ausgedehnte Felder von parallel gepackten, schlauchartigen Zysternen auf, die unregelmäßig im Cytoplasma verteilt sind (Bild 2, unten).

Glattes Endoplasmatisches Retikulum

Das glatte ER ist in kultivierten Hepatocyten schwer von anderen Vesikeln zu unterscheiden. Der Grund dafür liegt darin, daß die für die Leber und auch noch für isolierte Zellen typischen Glykogeneinschlüsse im Bereich des glatten ER fehlen. Dieser Befund paßt zu der biochemisch gemessenen, starken Abnahme des Glykogens innerhalb des ersten Kulturtages (128).

Golgi-Apparat

In Bild 1, unten Mitte ist ein für kultivierte Hepatocyten charakteristischer Golgi-Apparat dargestellt. Die Anzahl der übereinander liegenden Zysternen scheint geringen zu sein als in der Ganzleber und in isolierten Hepatocyten.

Lysosomen

Zahlreicher als in der Leber treten Lysosomen auf, die in Größe und Inhalt stark variieren. Sie sind häufig mit sehr elektronendichten, nicht weiter abbaubaren Lipidbestandteilen angefüllt (Bild 2, oben links) oder enthalten phagozytierte Zellorganellen, deren Konturen noch deutlich zu erkennen sind (Bild 2, oben Mitte).

Lipideinschlüsse und VLDL-Vesikel

Fetttropfen sind in fast allen kultivierten Zellen vom ersten Tag an vorhanden. Sie liegen ohne umgebende Membran im Cytoplasma. Ihre Größe ist variabel; kleinere Lipidtröpfchen verschmelzen zu größeren, mitunter riesigen Fettblasen (Bild 1, unten links). VLDL-Vesikel kommen in unterschiedlicher Größe vor. Sie sind von einer einfachen Membran umgeben und enthalten die für den Export aus der Zelle bestimmten Lipoproteinpartikel. In Bild 2, oben rechts ist die Vesikelmembran durch die Einwirkung von Filipin stark korrugiert, was auf einen relativ hohen Gehalt an Cholesterin schließen läßt.

Peroxisomen

Die Peroxisomen oder microbodies bestehen aus einer relativ homogenen Matrix, in die ein elektronendichter "core" eingelagert ist. In Bild 1, unten rechts ist dessen Streifenstruktur deutlich zu erkennen. Die Peroxisomen sind von einer einfachen Membran umgeben. In Morphologie und Anzahl sind sie nicht von denen der Leber zu unterscheiden.

Mikrofilamente und Mikrotubuli

Diesen Strukturelementen wird eine Funktion bei der Zellbewegung, Pinozytose und Sekretion zugeschrieben (27,144). Sie sind im gesamten intrazellulären Raum, an den Zellgrenzen jedoch häufiger zu finden.

3.1.2. Die Verteilung von Filipin-Cholesterin-Komplexen auf der Plasmamembran

Die charakteristischen Läsionen, die durch die Reaktion des Filipins mit Cholesterin hervorgerufen werden, erscheinen auf der E-Seite der gebrochenen Membran als Invaginationen mit einem konstanten Durchmesser von 25 nm und auf der P-Seite als entsprechend große Erhebungen, denen eine kleine zentrale Vertiefung ein kraterähnliches Aussehen verleiht (vergl. Bilder 4, 8 und 9). Bei frisch isolierten Zellen sind diese Filipin-Cholesterin-Komplexe gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt (Bild 4, oben rechts). Wenn die Zellen sich ausgebreitet und eine der Nachbarzelle anliegende Membran ausgebildet haben, dann sind auf dieser lateralen Membran kaum noch solche Komplexe zu finden. Die Grenze zwischen lateraler und Ober- bzw. Unterseite der Zellen ist durch eine scharfe Grenze markiert (Bild 4, Mitte); lediglich an Stellen neu entstehender Gallekanälchen sind Anhäufungen von Filipin-Cholesterin-Komplexen zu finden (Bild 4, Mitte und Ref.44). Die Plasmamembran der Zelloberseite ist wiederum gleichmäßig mit Filipin-Cholesterin-Komplexen besetzt, wobei kleine Vertiefungen, die "coated pits" entsprechen, ausgespart sind (Bild 4, unten links).

3.2. Die Gallekanälchen in der Kontrollkultur

3.2.1. Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild

Im Phasenkontrastmikroskop erscheinen die Gallekanälchen als helle, scharfrandige Bereiche zwischen benachbarten Zellen. Ihre Anzahl nimmt in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer und den Kultivierungsbedingungen zu. Während sie am ersten Kulturtag nur vereinzelt zwischen zwei Hepatocyten zu finden sind (Bild 5, oben), hat sich bis zum vierten Tag der Kultivierung ein Netzwerk aus anastomosierenden Schläuchen gebildet (Bild 5, unten).Zur Entwicklung der Gallekanälchen vergl. auch Ref. 70,71 .

3.2.2. Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild

Im elektronenmikroskopischen Bild lassen sich verschiedene Formen von Gallekanälchen erkennen, deren Charakteristika in den Bildern 6-8 dargestellt sind. Dabei sind sehr frühe Entwicklungsstadien nicht berücksichtigt (vergl. dazu Ref. 44).

Im allgemeinen erscheinen die Gallekanälchen in der Kultur als Erweiterung des Interzellularspaltes von unterschiedlicher Länge und Durchmesser, wobei die Lumina von mehr oder weniger deutlich ausgeprägten zonulae occludentes vom übrigen Interzellularraum abgeschlossen sind. Der Besatz mit Mikrovilli variiert von praktisch nicht vorhanden (Bild 6, Mitte) über teilweise vorhanden (Bild 6, oben rechts und oben links) bis zum vollständig ausgefüllten Lumen (Bild 6, unten links). Häufig befindet sich in sacculären Strukturen membranartiges Material (Bild 6, unten rechts), das oft die durch Filipin erzeugten charakteristischen Korrugationen aufweist (Bild 6, oben rechts).

Mit fortschreitender Kultivierung entstehen aus den anfänglich fokalen Gallekanälchen lange Schläuche (vergl.Abschn. 3.2.1., S. 44),die im Ultradünnschnitt als langgestreckte, von dünnen Plasmasepten unterbrochene Strukturen zu erkennen sind (Bild 7). Auch die Durchmesser solcher Schläuche können diejenigen von Gallekanälchen in vivo, die ca. 1 µm betragen, beträchtlich übersteigen. Vielfach ist der pericanaliculäre Raum mit Vesikeln unterschiedlicher Größe angereichert und es hat den Anschein, als würden diese mit der Membran des Gallekanälchens fusionieren.

Der Gefrierbruch erlaubt die Aufsicht auf große Membranflächen und ist deshalb zur Beurteilung von Membrandifferenzierungen besonders gut geeignet. Bild 8 zeigt zwei Gallekanälchen, deren tight junctions nur bruchstückhaft ausgebildet sind, während der Canaliculus in Bild 9 vollständig von tight junctions umrundet ist.

An Hand der Bilder 8 und 9 läßt sich auch die Anordnung von Intramembranpartikeln erläutern. Auf der dem Cytoplasma anliegenden Membranseite (protoplasmic face oder P-Seite) sind sie in der Regel stärker konzentriert als auf der ectoplasmatischen Seite (ectoplasmic face oder E-Seite). Die Partikel, die sich zu tight junction-Strängen zusammenfügen, bilden auf der P-Seite Erhebungen und auf der E-Seite Vertiefungen.

3.3. Einfluß von Taurolithocholat auf die Ultrastruktur

Die Behandlung der Kulturen mit Taurolithocholat führte zu charakteristischen ultrastrukturellen Veränderungen vor allem der Gallekanälchen. Die Läsionen konnten am häufigsten nach

... bis 6-stündiger Behandlung mit TLC beobachtet werden, unabhängig von Alter und vom Entwicklungsstadium der Kulturen (ausgenommen die Anfangsphase der Kultivierung).

Die typischen Veränderungen bestanden einerseits in bizarren Auffaltungen der canaliculären Membran, die häufig das gesamte Lumen der Gallekanälchen ausfüllten (Bild 10, oben und Bild 11, rechts) und die im Gefrierbruchbild als glatte, lamelläre Membranstapel zu identifizieren waren (Bild 10, unten und Bild 11, links). Andererseits traten stark dilatierte, sacculäre Gallekanälchen ohne Besatz von Mikrovilli auf (Bild 12).

Bezüglich der Verteilung von Filipin-Cholesterin-Komplexen in diesen beiden Strukturen war ein eklatanter Unterschied zu beobachten, während in den dilatierten Canaliculi und zum Teil in deren direkter Nachbarschaft eine starke Anhäufung von Cholesterin sowohl in der Membran als auch im Lumen auftrat - im Ultradünnschnitt als intensiv korrugiertes Membranmaterial (Bild 12) und im Gefrierbruch als Cluster von Filipin-Cholesterin-Komplexen zu erkennen (Bild 13) - fehlten solche Komplexe auf den Membranstapeln der bizarr transformierten Gallekanälchen vollständig. Darüberhinaus waren die Intramembranpartikel in den Lamellae stark reduziert oder gänzlich abwesend (Bild 10, unten und Bild 11, links). Desweiteren kam es unter dem Einfluß von Taurolithocholat in manchen Fällen zu einer extremen Proliferation von tight junctions, die, wie in Bild 14, links zu erkennen, große Flächen der Lateralmembran bedeckten. Dem entsprachen breite Kontaktzonen mit distinkten Berührungspunkten der benachbarten Zellmembranen, wie sie im Ultradünnschnitt (Bild 14, rechts) dargestellt sind.

Im Gegensatz zu den Gallekanälchen konnten an intrazellulären Organellen wie Kern, Mitochondrien, rER etc. keine Veränderungen nach TLC-Behandlung beobachtet werden. Dies deutet auf eine spezifische Interaktion der Substanz mit der Gallekanälchenmembran hin.

3.4. Einfluß von Chlorpromazin auf die Ultrastruktur

Die Wirkung des Chlorpromazins auf die Ultrastruktur der kultivierten Hepatocyten umfaßte einen Kurzzeit- und einen Langzeiteffekt. Die ersten beobachtbaren Veränderungen - 30 bis 60 Minuten nach Behandlungsbeginn - beinhalteten allgemeine Membranschädigungen wie eine Dilatation von rER und Kernmembran (Bild 15, unten links) und eine Verschiebung bzw. Verringerung der Interamembranpartikel, die vollständig glatte Membranbereiche entstehen ließen (Bild 18). Letzterer Effekt war insbesondere bei den Zellen erkennbar, die mit einer höheren Konzentration (0,25 mM) an CPZ inkubiert worden waren.

Spektakuläre Veränderungen in der zellulären Struktur stellten sich jedoch bei einer längeren Behandlung - 24 bis 48 Stunden - der Kulturen mit dem Pharmakon ein. So kam es zu einer dramatischen Anhäufung von multilammellären Vesikeln, die zumeist in lysosomale Strukturen eingeschlossen waren (Bild 15, oben rechts) und die häufig große Teile des Zellvolumens einnahmen (Bild 17, oben). Im Gefrierbruch erschienen solche Vesikel als Akkumulationen von zum Teil ungeordnetem, membranösem Material (Bild 17, unten rechts) von meist glatten Membranstapeln (Bild 17, unten links). Obwohl in einigen Fällen auch intensiv korrugierte Vesikel in solchen Lysosomen zu finden waren (Bild 15, unten rechts), spielte bei diesen

Membranveränderungen das Cholesterin augenscheinlich eine untergeordnete Rolle, was wiederum mit Hilfe des Filipins festgestellt werden konnte.

Eine mehr spezifische Veränderung hinsichtlich der Cholestase zeigte sich in einer starken Divertikulation mancher Gallekanälchen. Im Zuge dieser Veränderungen kam es zu einer ausgedehnten "Blasenbildung" in der Umgebung des Gallekanälchens, wobei vom Schnittbild her nicht immer zu entscheiden war, ob es sich um eine Aussackung des Lumens oder um große ectoplasmatische Vesikel handelte (Bild 15, Mitte). In Bild 16 ist ein entsprechender Canaliculus, wie er sich im Gefrierbruch darstellt, zu sehen.

3.5. Anionentransport

3.5.1. Die Darstellung und dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe

Um die Kopplung zwischen Fluoresceinisothiocyanat und den verschiedenen Aminen zu verfolgen, wurde die Dünnschichtchromatographie angewendet (vergl. Abschn. 2.7.2., S. 32/33). Als Laufmittel diente eine Mischung von Chloroform, Methanol und Eisessig im Verhältnis 35:15:5, womit die einzelnen Komponenten vollständig voneinander zu trennen waren. Die RF-Werte der Ausgangs-, End- und Referenzsubstanzen ergaben sich wie folgt:

Aminosäuren, Methyl- und Benzylamin 0,06 oder darunter(ausgenommen Phenylalanin mit 0,33);

Fluoresceinisothiocyanat	0,93;
Fluorescein	0,89;
Gly-FITC	0,56;
Lys-FITC	0,08;
Arg-FITC	0,23;
Glu-FITC	0,48;
Phe-FITC	0,78;
Benzylamin-FITC	0,88;
Methylamin-FITC	0,78.

Unter Zugrundelegung des dünnschichtchromotographischen Nachweises konnte der Umsatz des Fluoresceinisothiocyanats mit den meisten Komponenten, vor allem mit Glycin- und mit Gly-FITC wurde im wesentlichen gearbeitet - als quantitativ angesehen werden. Allerdings sollten die Farbstoffe zur weiteren Charakterisierung einer Reinigung unterzogen werden. Erste

Versuche mit präparativer Dünnschichtchromatographie konnten aus Zeitgründen nicht zu Ende geführt werden.

3.5.2. Der Unterschied zwischen dem Fluorescein- und dem Gly-FITC-Transport

Inkubiert man die Kulturen für eine gewisse Zeit mit Flurescein, so beginnt zuerst die Monolayer zu fluoreszieren und nachfolgend erscheint der Farbstoff in den Gallekanälchen. Durch Nachinkubation mit Fluorescein-freiem Medium kann man es erreichen, daß nur noch die Gallekanälchen fluoreszieren. (Die Aufnahme und Sekretion von Fluorescein ist detailliert in Ref. 42 beschrieben.) Inkubiert man dagegen unter gleichen Bedingungen mit Gly-FITC, so erscheint die Fluoreszenz innerhalb von 10-15 Minuten in den Gallekanälchen; die Zellen selbst bleiben schwarz.

An Hand der Bilder 19 und 20 wird der Unterschied zwischen Fluorescein (Bild 19) und Gly-FITC (Bild 20) demonstriert. Es sind, wie auch in den folgenden Bildern, jeweils eine Fluoreszenz-und die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme dargestellt, damit im Fluoreszenzbild leuchtende Strukturen den entsprechenden Gallekanälchen im Phasenkontrastbild zugeordnet werden können.

3.5.3. Der Einfluß von Phenobarbital auf den Transport des Gly-FITC

Phenobarbital ist als choleretisch wirksames Agens bekannt (32). Auf die Hepatocytenkultur angewendet, zeigt es gleichartige Wirkungen, die sich auch im Transport von Gly-FITC niederschlagen. In Bild 21 ist der Unterschied zwischen zwei Zellmonolayern dargestellt, von denen eine mit (untere Bild-

hälfte) und die andere ohne Phenobarbital kultiviert wurde (obere Bildhälfte). Bei gleicher lichtoptischer Vergrößerung fällt besonders eine starke Erweiterung der Gallekanälchen in den behandelten gegenüber den unbehandelten Kulturen auf. Das drückt sich sowohl im Phasenkontrastbild (rechts) als auch im Fluoreszenzbild (links) aus. Darüber hinaus schienen die Gallekanälchen dichter zu sein, wenn sie aus Phenobarbitalkulturen stammten. Sie waren zumeist länger imstande, den Fluoreszenzfarbstoff zu halten, als solche aus Kontrollkulturen. (Der Einfluß von Phenobarbital auf die Ausbildung von Gallekanälchen in der Hepatocytenkultur wurde von Klose in Ref. 70 genauer untersucht)

3.5.4. Sucrosebehandlung

Um zu klären, ob sich die Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch in den Gallekanälchen anreichern, wurden Kulturen zuerst mit Gly-FITC inkubiert und daran anschließend einer 1 M Sucroselösung ausgesetzt. Auf Grund ihrer Hypertonie führte diese zum Aufbrechen der tight junctions und zum Entleeren der Gallekanälchen. Der Vorgang setzte unmittelbar nach Zugabe der Sucroselösung ein; er konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Zunächst entstand im Zentrum der Gallekanälchen eine dunklere Zone, die sich innerhalb von Sekunden vergrößerte. Nach 1 Minute waren die erweiterten Zellzwischenräume nur noch von fluoreszierenden Rändern markiert (Bild 22), die auch nach 5 bzw. 10 Minuten nicht verschwunden waren (Bild 23). Die Zellstruktur wurde innerhalb dieses Zeitraums nicht sichtbar geschädigt.

3.5.5. Hemmung des Transports von Gly-FITC

3.5.5.1. Entzug von Natrium

Wurde den Kulturen Gly-FITC in einem Medium angeboten, das keine Natriumionen enthielt, so war die Aufnahme und infolgedessen auch die Sekretion des Farbstoffes total blockiert. Weder in den Zellen noch in den Gallekanälchen konnte Fluoreszenz entdeckt werden. Lediglich auf der Monolayer haftende tote Zellen waren leicht angefärbt (Bild 24, oben).
Eine 20-minütige Nachinkubation der solchermaßen behandelten Kulturen mit Gly-FITC in Natrium-haltigem Medium führte wiederum zu fluoreszierenden Gallekanälchen (Bild 24, unten).

3.5.5.2. Ouabain

Die Tatsache, daß für die Aufnahme des Gly-FITC in die Zellen die Anwesenheit von Natrium notwendig ist, ließ eine Beteiligung der NaK-ATPase an dem Prozeß vermuten. Es wurde deshalb versucht, den Transport mit Ouabain zu unterbinden. Allerdings konnte weder durch eine steigende Hemmstoffkonzentration (bis 1 mM) noch durch eine 1-stündige Vorbehandlung der Zellen mit Ouabain eine sichtbare Hemmung erzielt werden; das Fluoreszenzbild unterschied sich nicht von solchen, die ohne den Inhibitor entstanden waren.

3.5.5.3. Fluoresceinamin

Die gleichzeitige Anwesenheit von Gly-FITC und Fluoresceinamin, das selbst nicht fluoresziert, führte dazu, daß die Monolayer leuchtete, die Gallekanälchen jedoch absolut leer blieben. Bereits ein geringer Überschuß des Amins - Isomer II (ca. 2:1 gegenüber Gly-FITC) ließ diesen Effekt erkennen. Ein Überschuß

von 5:1 resultierte in einer hell fluoreszierenden Monolayer, von der sich die Gallekanälchen auch noch nach 40-minütiger Inkubation als schwarze Zwischenräume abhoben (Bild 25). Die Blockierung der Sekretion erwies sich als reversibel; sie konnte durch Nachinkubation mit einem Medium ohne das Amin rückgängig gemacht werden (nicht gezeigt). Mit dem Isomer I des Fluoresceinamins wurde ein gleichartiger Effekt beobachtet, der jedoch in seiner Ausprägung nicht so deutlich war wie der mit dem Isomer II.

3.5.6. Andere Aminosäuren als Kopplungskomponenten; Carboxyfluorescein

Außer Glycin wurden die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, die saure Aminosäure Glutamat und die aromatische Aminosäure Phenylalanin an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelt, um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Ladung das Transportverhalten der jeweiligen Farbstoffe beeinflussen würden. Es ergab sich jedoch bei allen Verbindungen ein dem Gly-FITC äquivalentes Bild. Nach 10-15 Minuten oder länger war Fluoreszenz nur in den Gallekanälchen zu finden, die Zellen selbst blieben dunkel, ausgenommen tote Zellen, die, abgerundet, der Monolyer oben anhafteten. Es konnten allenfalls Unterschiede in der Intensität, nicht jedoch in der Verteilung der Fluoreszenz festgestellt werden, die möglicherweise auf die unterschiedlichen Ladungen der gekoppelten Aminosäuren zurückzuführen sind. Als Beispiel für alle außer Glycin angewendeten Aminosäuren ist in Bild 26 eine Kultur dargestellt, die mit Lys-FITC inkubiert wurde.

Auch als dem Inkubationsmedium statt FITC-Aminosäuren Carboxy-

fluorescein zugesetzt wurde, das an Stelle der Isothiocyanatgruppe (vergl. Abb. 4 , S. 35) eine Carboxylgruppe trägt, änderte sich nichts an dem Transportverhalten: eine schnelle Sekretion führte zur Anreicherung des Farbstoffes in den Gallekanälchen, ohne daß die Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wurden.

3.5.7. Methylamin-FITC und Benzylamin-FITC

An Stelle einer Aminosäure kann jedes beliebige Amin an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelt werden. Es ergibt sich so die Möglichkeit, die Molekülstruktur in einem weiten Bereich zu verändern und deren Einfluß auf das Transportverhalten der Substanz zu untersuchen. Durch die Kopplung des kurzkettigen aliphatischen Amins Methylamin und des aromatischen Amins Benzylamin wurde das Farbstoffmolekül in unterschiedlichem Ausmaß in Richtung Lipophilie verändert. Diese Änderung gegenüber den FITC-Aminsosäuren drückte sich in einer längeren Verweildauer des Farbstoffs in den Hepatocyten aus, wobei nach der Inkubation mit Methylamin-FITC eine nur schwache (Bild 27), mit Benzylamin-FITC jedoch eine deutlich, in ihrer Intensität derjenigen des Fluoresceins vergleichbare Fluoreszenz der Monolayer zu beobachten war (Bild 28).

4. Diskussion

4.1. Ultrastrukturelle Untersuchungen

4.1.1. Die Ultrastruktur von Gallekanälchen in der Kontrollkultur

Auf die Neuausbildung gallekanälchenartiger Strukturen in Kulturen von Rattenhepatocyten wird übereinstimmend von allen Autoren hingewiesen, die sich mit den ultrastrukturellen Aspekten kultivierter Leberzellen befaßt haben. Sowohl in subkultivierten Zellen, die aus foetaler (76) bzw. neonataler Leber (100) stammen, als auch in Primärkulturen von Hepatocyten aus adulten Tieren (19,61,85,122,150), ist das Auftreten dieser lebertypischen Differenzierung struktureller Ausdruck einer wiedergewonnenen biliären Polarität. Die submikroskopische Morphologie der Gallekanälchen ist in vielen Einzelheiten derjenigen *in vivo* vergleichbarer (17,27,95,120,144). So sind die charakteristische Auffaltung der canaliculären Membran zu Mikrovilli, die das Lumen mehr oder weniger ausfüllen, das Vorhandensein von Zellkontakten wie tight junctions (zonulae occludentes), intermediate junctions (zonulae adherentes) und Desmosomen (maculae adherentes), sowie eine weitgehend Organellen-freie Zone, die das Gallekanälchen umgibt (pericanaliculäres ectoplasma), hervorzuheben (vergl. Ref. 27, 95).

Über die Orientierung des Golgi-Apparates, die *in vivo* u.a. Ausdruck der funktionellen Polarität der Leberzellen ist (27), gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. Wanson et al. (150) beschreiben eine solche Orientierung bereits in eintägigen Kulturen, während sie von Chapman und Mitar-

beitern (19) ausdrücklich verneint wird. Aus unseren Befunden läßt sich in dieser Hinsicht keine eindeutige Aussage ableiten, da Gallekanälchen sowohl mit (vergl. Bild 1, Mitte und Bild 7, links unten) als auch ohne (vergl. Bild 6, Mitte und Bild 7) umgebende Golgifelder gefunden werden können. Allerdings sind sehr häufig Vesikel unterschiedlicher Größe in der pericanaliculären Zone zu finden (vergl. Bild 6 und 7), die möglicherweise vom Golgi-Apparat abstammen und durch Verschmelzen mit der Gallekanälchenmembran zur Vergrößerung des Lumens beitragen könnten.

Detaillierte Beschreibungen der Ultrastruktur von Gallekanälchen kultivierter Hepatocyten, die auch auf Aspekte verschiedener Entwicklungsstadien und der besonderen Bedingungen in der Kultur Rücksicht nehmen, wurden zuerst von Wanson et al. (150) und neuerlich, auch unter Anwendung cytochemischer Methoden, von unserem Laboratorium gegeben (44,61). Wanson und Mitarbeiter (150) sehen in der Formierung von Golgi-Feldern an der Zellperipherie möglicherweise die Initiation der Canaliculus-Entstehung, wobei die Gleichzeitigkeit der Ausbildung von Mikrovilli und Zellkontakten hervorgehoben wird. Diese Betrachtungsweise wird durch die Befunde von Gebhardt et al. (44) und Robenek et al. (117) unterstützt, wonach bei der Entstehung der Gallekanälchen und der tight junctions der Verteilung des Cholesterins in der Lateralmembran eine Schlüsselrolle zukommt. Dabei ist nicht auszuschließen, daß die Verschmelzung cholesterinreicher sekretorischer Vesikel des Golgi-Apparates (96) den Prozeß, der schließlich zu "reifen" Gallekanälchen führt, in Gang setzt.

Betrachtet man zu einem gegebenen Zeitpunkt alle in einer Kul-

tur vorkommenden Formen von Gallekanälchen, so wird eine große Heterogenität deutlich, die auch in den Bildern 6 und 7 dargestellt ist und deren Ursachen sowohl in den verschiedenen Entwicklungsstadien als auch in den Kulturbedingungen an sich begründet sind (44,61). Man muß sich dieser Tatsache bewußt sein, wenn die Wirkung cholestatischer Argenzien auf die Ultrastruktur der Canaliculi beurteilt werden soll.

4.1.2. Filipin als cytochemischer Cholesterinmarker

Mit der Einführung des Polyenantibiotikums Filipin in die Cytochemie, in Verbindung mit der Gefrierbruchtechnik, konnte eine heterogene Verteilung von Cholesterin in vielen verschiedenen biologischen Membranen nachgewiesen werden (30,37, 61,96, 117, 148). Die Wirkungsweise des Filipins in situ ist nicht in allen Einzelheiten bekannt. Daß es sich dabei jedoch um eine stereochemisch spezifische und stöchiometrisch definierte Reaktion mit Cholesterin bzw. Cholesterin-ähnlichen Verbindungen handelt, konnte an Hand von spektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden, wobei das planare Sterol-Ringsystem, die 3ß-OH-gruppe und die Cholesterinseitenkette für die Bindung von Bedeutung sind (94).

Die eindeutige ultrastrukturelle Lokalisierung des Cholesterins erfordert allerdings eine gleichzeitige Fixierung des Gewebes, da in unfixiertem Material erhebliche Membranschädigungen durch Filipin hervorgerufen werden, welche die Interpretation erschweren (118). In gut fixierten Proben erscheinen Filipin-Cholesterin-Komplexe im Gefrierbruch als Protuberanzen bzw. Invaginationen der Membran (vergl. Abschn.3.1.2., S.43). Ihre einheitliche Geometrie und ein konstanter Durchmesser von 25 nm erleichtern die Identifikation dieser charakteristischen

Membranläsionen. Im Ultradünnschnitt sind Filipin-Cholesterin Komplexe als Korrugationen zu erkennen, die den betroffenen Membranen ein wellblechähnliches Aussehen verleihen. Horizontal geschnittene Komplexe bilden kleine Kreise, die im Durchmesser den Protuberanzen im Gefrierbruch entsprechen. (Zu den typischen Membranlasionen siehe Bilder 9,12 und Ref. 118). Andere spezifische Marker wie die Saponine Digitonin und Tomatin ergaben eine gleichartige Lokalisierung von Membrancholesterin (30) und unterstützen damit die Aussagekraft der Filipinreaktion, die den Saponinen deshalb überlegen ist, weil sie insgesamt nur geringfügige Membranschädigungen hervorruft, während letztere die Gesamtstruktur der Membran stark beeinträchtigt (116). Von Severs und Mitarbeitern (136) wurde allerdings darauf hingewiesen, daß in Regionen hoher Proteindichte die Digitoninreaktion zwar positiv, die Filipinreaktion jedoch negativ sein kann.

4.1.3. Einfluß von Taurolithocholat auf die Ultrastruktur

Frühere Studien beschreiben charakteristische morphologische Veränderungen des Gallepols, hervorgerufen durch die Behandlung von Ganztieren (88,90) bzw. perfundierten Lebern (89) mit Taurolithocholsäure oder mit Na-Taurolithocholat. Dabei kommt es zur Dilatation der Gallekanälchen unter Verlust der Mikrovilli, zur Verdichtung des Ectoplasmas und insbesondere zu einer für die Cholestase typischen bizarren Auffaltung der canaliculären Membran. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Charakteristika, die in der intakten Leber gefunden wurden, auch in einem in vitro System nachvollzogen werden.

Die Taurolithocholat-induzierte Cholestase wurde mit einem stark erhöhten Cholesteringehalt der Gallekanälchenmembran in Verbindung gebracht (64), wobei sich auch das Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden um ein Vielfaches nach oben verschiebt (63). Auf Grund dieser biochemischen Messungen, die an isolierten Plasmamembransubfraktionen des apikalen Pols vorgenommen wurden, stellten Kakis et al. (63) die These auf, daß ein erhöhter Cholesterineinbau in die luminale Seite der Bilayer für die sizzarte Transformation der Kanälchenmembran verantwortlich sei. Von diesen Autoren wurde allerdings nicht der Versuch unternommen, das Cholesterin in situ zu lokalisieren. Dagegen wurde von Bonvicini et al. (9) die Digitoninreaktion auf TLC-behandelte Lebern angewendet. Sie fanden sowohl im Cytoplasma als auch im Lumen der Gallekanälchen typische Strukturen, die auf eine Ausfällung von freiem Cholesterin durch Digitonin hinwiesen. Ihre Interpretation, daß luminales Cholesterin von der Membran der Gallekanälchen stammt, konnte durch unsere Arbeiten untermauert werden. Dabei handelt es sich jedoch nur um solche Gallekanälchen, die durch die Einwirkung des Taurolithocholats eine starke Dilatation erfahren hatten. Starke Anhäufungen von Filipin-Cholesterin-Komplexen, die im Gefrierbruch deutlich zu erkennen waren (vergl. Bild 13), ließen sich im Ultradünnschnitt als intensiv korrugierte Membranvesikel im Lumen identifizieren, die häufig noch in Kontakt mit der Kanälchenmembran standen (vergl. Bild 12). Diese teilweise Zerstörung der Membran, die auch von in vivo Versuchen berichtet wird, (15) ist höchstwahrscheinlich auf einen daramatisch erhöhten Einbau von Cholesterin - und nicht etwa auf die Wirkung

des Filipins - zurückzuführen, der die Insuffizienz der betroffenen Membranbereiche und ihre Abstoßung nach sich zieht.

Insofern befinden sich unsere wie auch Bonvicinis (9) cytochemische Befunde mit den biochemischen Messungen von Kakis et al. (63) in Übereinstimmung. Darüberhinaus sind isolierte Gallekanälchenmembranen immer auch von Teilen der Lateralmembran verunreinigt, die, wie in Bild 13 dargestellt, häufig Cluster von Cholesterin enthalten und somit teilweise für die Erhöhung des Cholesteringehalts in der Gallemembranfraktion verantwortlich gemacht werden können.

Ganz im Gegensatz zu den dilatierten Gallekanälchen sind die bizarr transformierten Membranen absolut frei von Filipin-Cholesterin-Komplexen. Darüberhinaus ist die Anzahl der Intramembranpartikel, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Membranproteine handelt (140), stark reduziert oder sie fehlen ganz (vergl. Bilder 10 und 11). Eine solche "Extraktion" von Intramembranpartikeln - insbesondere von den Mikrovilli - die nur mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik zu erkennen ist, wurde bereits von Miyai et al. (88) beschrieben. Über die zugrundeliegenden Mechanismen kann bisher nur spekuliert werden. Möglicherweise spielt aber das Verschwinden des Cholesterins aus der Membran oder eine erhöhte Inkorporation von Phospholipiden dabei eine Rolle.

Die Hypothese von Kakis et al. (63), wonach die lamelläre Transformation durch einen vermehrten Cholesterineinbau in die Canaliculusmembran zustande kommt, kann durch unsere Ergebnisse nicht gestützt werden. Vielmehr läßt sich auf Grund des Fehlens charakteristischer Filipinläsionen eindeutig auf die Abwesenheit

des Cholesterins von den bizarren Membranen schließen. Für diese spezifische Veränderung des Gallepols unter dem Einfluß von Taurolithocholat scheinen komplexere Ursachen verantwortlich zu sein, welche die Entfernung des Cholesterins und der Intramembranpartikel einschließen. Ob es sich bei den glatten Lamellen um reine Phospholipidbilayer handelt, die für sich alleine kaum zu einer Sekretion fähig wären, muß noch mit geeigneten cytochemischen Methoden untersucht werden.

Auf Grund der vorliegenden Befunde lassen sich wichtige Schlüsse über die Taurolithocholat-induzierte Cholestase ziehen: Die ultrastrukturellen Läsionen betreffen vor allem den Gallepol; intrazelluläre Organellen sind kaum betroffen. Die chemische Zusammensetzung der Kanälchenmembran wird entweder durch einen vermehrten Einbau oder durch die Extraktion von Cholesterin verändert. Ersteres bezieht sich vor allem auf dilatierte, zweiteres auf lamellär transformierte Gallekanälchen. Ob beide Formen von Veränderungen aus einander hervorgehen oder ob eine die Folge der anderen ist, darf bezweifelt werden. Vielmehr spielt neben einer veränderten Membranfluidität, die nach aller Wahrscheinlichkeit ein wichtiger Parameter für einen funktionierenden Sekretionsprozeß ist (15,63,93), wohl auch das Verschwinden von Enzymen des Gallepols, das sich in der Reduktion der Intramembranpartikel ausdrückt, eine Rolle bei der gestörten Gallesekretion.

Die verschiedenartige Reaktion einzelner Gallekanälchen auf die TLC-Behandlung sowohl in vivo (64,78) als auch in unseren Versuchen, mag durch unterschiedliche Konzentrationen der Substanz bedingt sein, welche die einzelnen Hepatocyten erreichen. Auch der Schutz durch intrazellulär vorhandene Cholsäure bzw. Tauro-

cholsäure, vergleichbar dem durch Infusionen entsprechender Gallensäuren (94), könnte für individuelle Hepatocyten unterschiedlich sein.

4.1.4. Einfluß von Chlorpromazin auf die Ultrastruktur

Die Wirkung des Chlorpromazins besteht in erster Linie in einer Schädigung der zellulären Membranen. Dies wird sowohl in unseren Ergebnissen als auch in Befunden anderer Autoren deutlich, die verschiedene experimentelle Systeme angewendet haben. Studien am Ganztier ergaben, daß durch die Infusion pharmakologischer Dosen von Chlorpromazin eine dosisabhängige und reversible Reduktion des gallensäureunabhängigen Galleflusses erzeugt werden kann (119). Dies warf die Frage nach einer spezifischen Hemmung der NaK-ATPase durch das Pharmakon auf. In Untersuchungen an isolierten Plasmamembranen bzw. isolierten Gallekanälchen stellte sich heraus, daß nicht nur die NaK-ATPase, sondern auch die Mg-ATPase dosisabhängig und reversibel durch Chlorpromazin gehemmt werden kann (65,121), während die 5' Nucleotidase, ein anderes Enzym der Plasmamembran, nicht betroffen ist (65). Die der Sekretionshemmung zugrunde liegenden ultrastrukturellen Veränderungen wurden an der perfundierten Leber (54) und am Ganztier (5) untersucht.

Eine andere Möglichkeit der direkten Beeinflussung der Gallesekretion, unabhängig von der Hemmung der oben beschriebenen ATPasen, wird von Carey et al. (18) zur Diskussion gestellt. Auf Grund seiner Eigenschaften als tertiäres Amin (vergl. Formel S. 17), liegt Chlorpromazin unter physiologischen Bedingungen als Kation vor und vermag als solches Gallensäuren in molaren Verhältnissen zu präzipitieren. Da Chlorpromazin selbst auch

in die Galle sezerniert wird, kann es dort mit Gallensäuren reagieren, diese damit osmotisch unwirksam machen und auf diese Weise den Fluß von Wasser reduzieren.

Außer an Gallensäuren vermag Chlorpromazin auch spezifisch an negativ geladene Membranlipide, insbesondere an Phosphatidylserin zu binden und sie entweder aus der Membran zu lösen (18), oder selbst in die Membran zu interkalieren. Auf letztere Möglichkeit wurde besonders von Sheetz und Singer (137) hingewiesen, die u.a. mit Hilfe des Chlorpromazins die asymmetrische Verteilung von Membrankomponenten untersuchten. Permeabilitätsänderungen sowohl der Plasma- als auch der Mitochondrienmembran in isolierten Hepatocyten (147) und eine allgemeine Störung der Membranfluidität (65) sind auf Grund solcher Mechanismen leicht vorstellbar.

Mit den genannten physikalisch-chemischen Effekten, die der Wirkung des Chlorpromazins zugrunde liegen, lassen sich auch die in dieser Arbeit sowie von Hruban et al. (54) beobachteten ultrastrukturellen Schädigungen erklären. Kurzzeiteffekte wie eine Dilatation des rauhen ER und der Kernmembran und vor allem die beobachtete Verschiebung bzw. Extraktion von Intramembranpartikeln (vergl. Bild 18) können eine Folge der Bindung des Chlorpromazins an Membrankomponenten wie Phosphatidylserin sein. Im Falle einer irreversiblen Bindung werden die betroffenen Membranen in ihrer Struktur derart verändert, daß sie ihre Funktion nicht mehr wahrnehmen können. Als Folge davon werden sie in Autophagosomen aufgenommen, die sich bei längerer Einwirkung der Droge anhäufen. Offenbar lassen sich die durch Chlorpromazin modifizierten Lipide mit den der Zelle zur Verfügung stehenden Mitteln nicht vollständig abbauen, sodaß es

zur Akkumulation der charakteristischen, myelinähnlichen Membranrollen kommt.

Diese mehr globale Wirkung des Chlorpromazins auf die Membranarchitektur wird begleitet von der Beeinträchtigung einzelner Membrankomponenten, die für ihre Funktion auf eine intakte Umgebung angewiesen sind. Dazu gehören Membranenzyme (20) wie die NaK- und die Mg-ATPase. Es liegt nahe zu vermuten, daß die von Samuels et al. (121) und Keefe et al. (65) beschriebene Hemmung der ATPasen zumindest teilweise durch derartige Mechanismen bedingt ist, obwohl Samuels et al. (121) von einer direkten Interaktion des Chlorpromazins bzw. eines Metaboliten mit den Enzymen ausgehen. Da die NaK-ATPase bevorzugt an der basolateralen und die Mg-ATPase an der apikalen Seite der Hepatocyten lokalisiert ist (77,153), dürften sowohl Aufnahme- als auch Sekretionsprozesse, die zur Gallebildung beitragen, betroffen sein. Insofern verursacht das Chlorpromazin keine spezifische, vornehmlich den Gallepol betreffende Veränderung der Plasmamembran, vergleichbar derjenigen unter TLC-Einwirkung.

Allerdings kommt es auch in der CPZ-Cholestase zu einer Dilatation und Divertikulation der Gallekanälchen, die auch mit einer Vakuolisierung des Cytoplasmas, insbesondere der pericanaliculären Region, einhergeht. Die Ursache dafür sehen Hruban und Mitarbeiter (54) in einem Mißverhältnis zwischen der Neubildung und der Degradation von Plasmamenbranteilen, also einem insgesamt gestörten Membranfluß. Ein derartiger Einfluß des Chlorpromazins dürfte sich jedoch nicht auf die Membran der Gallekanälchen alleine beschränken, sondern ebenfalls Auswirkungen aufder sinusoidalen Seite haben.

Das Cholesterin spielt nach unseren Beobachtungen bei der Entstehung der CPZ-Cholestase eine untergeordnete Rolle. Zwar finden sich in den Autophagosomen u.a. auch korrugierte Membranfragmente, der weitaus überwiegende Anteil der myelinartig aufgewickelten Membranen zeigt jedoch keine Anzeichen einer Filipin-Cholesterin-Reaktion. Es wäre denkbar, daß durch die Bindung des Chlorpromazins an geladene Phospholipide das Filipin in seiner Wirkung behindert wird, ähnlich dem Befund, nach welchem in proteinreichen Membranregionen die Filipin-Reaktion versagt hat (136). Allerdings liegen dafür bisher keine experimentellen Hinweise vor. Insgesamt scheint für die Genese der CPZ-Cholestase ein mehr allgemeiner membrantoxischer Effekt des Chlorpromazins oder seiner Metabolite und weniger eine spezifische Interferenz mit Mechanismen der Gallesekretion verantwortlich zu sein. Diese Ansicht wird von Balázs und Juházs (5) unterstützt, die in langfristigen in vivo Experimenten nur geringfügige Veränderungen am Gallepol feststellen konnten. Dagegen waren eher cytoplasmatische Organellen wie Mitochondrien, Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum betroffen. Im Falle des Chlorpromazins könnte man daher von einer sekundär sich entwickelnden Cholestase sprechen, in Anlehnung an eine Aussage von Popper (103), nach welcher die beobachteten funktionellen und morphologischen Veränderungen auch Ursache und nicht nur Resultat einer intrahepatischen Cholestase sein können.

4.2. Anionentransport

4.2.1. Allgemeines

Endogene und exogene organische Anionen werden von den Hepatocyten aus dem Blut aufgenommen und nach der Passage durch die Zellen, die häufig Biotransformationsvorgänge am sER einschließt, wieder ausgeschieden. Die Größe und die Polarität des Moleküls nach der Konjugation ist für den Ausscheidungsweg ausschlaggebend. Substanzen mit einem Molekulargewicht größer etwa 300 gelangen in die Galle, während solche geringerer Molekülgröße den Organismus via Niere verlassen (vergl. Ref. 86 und darin zitierte Arbeiten). In frühen Arbeiten wurde die Ausscheidung von gut meßbaren Xenobiotica, meist anionische Farbstoffe, in die Galle an Ganztieren untersucht, um Aufschlüsse über die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten (für Review siehe Ref. 141). 1952 erschien eine umfassende Arbeit von Hanzon (50), in der die Sekretion von Na-Fluorescein (Uranin) in die Gallekanälchen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Ratten untersucht wurde. Danach gelangt intravenös injiziertes Uranin innerhalb von Sekunden in die Leberzellen und bereits nach 1 Minute kann eine beginnende Anreicherung in den Gallekanälchen festgestellt werden. Farbstoffe wie Bromosulfophthalein (BSP) und Indocyanin Grün (ICG), die ähnlich schnell aus dem Blut extrahiert werden und in die Galle gelangen, wurden und werden noch zur Prüfung der Leberfunktion eingesetzt (46,79). Über die Mechanismen der Aufnahme und Sekretion von organischen Anionen wurde in diesen frühen Arbeiten nur spekuliert. So nahm Sperber (141) für alle in die Galle sezernierten Anionen, inklusive Gallensäuren, Bilirubin und xenobiotische Farbstoffe,

einen einheitlichen Carrier an, den er "Gallensäure-Transportmechanismus" nannte und einem entsprechenden Mechanismus in der Niere gegenüberstellte. Allerdings wurde die Möglichkeit intrazellulärer Bindungsproteine für Xenobiotica und auch verschiedene Carrier für die Aufnahme bzw. für die Sekretion in Betracht gezogen. Intrazelluläre Proteine wie Ligandin und Z-Protein, die ein ganzes Spektrum von Anionen zu binden vermögen, wurden in der Zwischenzeit isoliert und charakterisiert (für Review siehe Ref. 2). Auch konnten in der Plasmamembran von Hepatocyten spezifische Proteine identifiziert werden, die vermutlich als Carrier für Bilirubin und Xenobiotica, nicht jedoch für Gallensäuren fungieren (108,109,146).

Die Aufnahme an der Sinusoidalmembran ist als sättigbarer und hemmbarer Prozeß charakterisiert (47,126,132), wobei die Aufnahme der Gallensäuren wahrscheinlich als Co-Transport mit Natrium funktioniert (Review in Ref.8), während die Aufnahme organischer Anionen als von extrazellulärem Natrium unabhängig beschrieben ist (87). Ob es nun für Gallensäuren und andere Anionen einen gemeinsamen, oder ob es verschiedene Carrier gibt, scheint noch nicht restlos geklärt zu sein (Review in Ref. 36).

Über die Sekretion am Gallepol vermochten die etablierten experimentellen Modelle - Ganztier, perfundierte Leber, isolierte Hepatocyten - bisher keine detaillierten Aufschlüsse zu liefern. Auf der einen Seite wird ein Carrier-Transport diskutiert, der für ein ganzes Spektrum von organischen Anionen zuständig und sowohl von dem Mechanismus der Anionen-

aufnahme als auch von der Gallensäuresekretion unterschiedlich sein soll (für Review siehe Ref. 130). Andererseits deuten Ergebnisse von Scharschmidt und Schmid (124) auf die Möglichkeit einer einfachen bzw. erleichterten Diffusion der Anionen über die Gallemembran hin.

Vor diesem Hintergrund wurde der Anionentransport in kultivierten Hepatocyten untersucht, von denen in jüngster Zeit nachgewiesen wurde, daß sie in wichtigen Teilbereichen zu einer biliären Sekretion fähig sind (6,40,42).

4.2.2. Der Unterschied zwischen dem Fluorescein- und dem Gly-FITC-Transport

Fluorescein und Gly-FITC zeigen eine unterschiedlich lange Verweildauer in den Zellen, wenn sie den Kulturen - unter gleichen Bedingungen - angeboten werden (siehe 3.5.2.,S.50 und Bilder 19 und 20). Während Fluorescein vor dem Erscheinen in den Gallekanälchen die Zellen selbst zum Fluoreszieren bringt (42), kann Gly-FITC intrazellulär nicht nachgewiesen werden. Legt man einen transzellulären Transport zugrunde, so läßt dieser Befund eigentlich nur den Schluß zu, daß die Exkretion des Gly-FITC einerseits schneller als die des Fluoresceins und andererseits wesentlich rascher als seine Aufnahme sein muß. Der Grund dafür liegt höchstwahrscheinlich darin, daß mit dem Glycin eine zusätzliche anionische Gruppe in das FITC-Molekül eingeführt wird. Damit steigen dessen Polarität und Wasserlöslichkeit. Eine Konjugation mit Glucuronsäure o.ä., die für die Gallegängigkeit lipophiler Substanzen Voraussetzung ist (1), dürfte damit überflüssig werden und der schnelle Transport durch das Cytoplasma zum Gallepol wäre

so erklärbar. Andererseits ist es wahrscheinlich, daß aus der veränderten Molekülstruktur des Gly-FITC gegenüber dem Fluorescein eine unterschiedliche Affinität zu intrazellulären Bindungsproteinen resultiert, die möglicherweise auch am transzellulären Transport der Xenobiotica beteiligt sind, zumindest jedoch deren freie Konzentration in der Zelle bestimmen (2). Die freie Konzentration ist aber ein die Geschwindigkeit des Austransports determinierender Parameter.

Die Annahme einer schnellen Exkretion, die nach unseren Beobachtungen für den Gesamtprozeß des Anionentransports nicht geschwindigkeitsbestimmend sein kann, steht im Widerspruch zu den Befunden von Schwarz und Mitarbeitern (133), die in isolierten Hepatocyten die Sekretionsgeschwindigkeit von BSP zu lediglich 6% der Aufnahmegeschwindigkeit bestimmten. Obwohl für die Maximalgeschwindigkeit der Sekretion ähnliche Werte gefunden wurden wie bei Ratten in vivo (133), darf angezweifelt werden, daß isolierte Zellen ein geeignetes System für die Untersuchung biliärer Sekretionsvorgänge darstellen, da ein strukturell intaktes biliäres Kompartiment vollständig fehlt. Wenn die Annahme von Scharschmidt und Schmid (124) richtig ist, daß nämlich die Bindung von organischen Anionen an Gallensäure-Lipid-Mizellen die freie Konzentration der Anionen in der Galle herabsetzt und so zu deren Nachstrom aus den Hepatocyten beiträgt, dann ist eine langsame Exkretion in isolierten Hepatocyten nicht verwunderlich, da besagte Mizellen in der Zellsuspension allenfalls in sehr niedriger Konzentration vorliegen können.

4.2.3. Der Einfluß der Kopplungskomponente auf den Transport der FITC-Derivate

Die Überlegung, daß die Ladung der an das FITC gekoppelten Komponente für das Transportverhalten der Farbstoffe mitverantwortlich ist, führte dazu, daß Aminosäuren unterschiedlicher Ladung und Lipophilie sowie neutrale Amine als Kopplungskomponenten verwendet wurden. Die unterschiedliche Polarität der Endprodukte drückt sich in den RF-Werten aus, die sich bei der Dünnschichtchromatographie in dem verwendeten Laufmittel ergaben. Dabei lagen die RF-Werte des Phe-FITC, des Benzylamin- und Methylamin-FITC und des unveränderten Fluoresceins sehr nahe beieinander (vergl. Abschn. 3.5.1., S. 49). Es ergab sich jedoch bei den verschiedenen Aminosäuren visuell kein Unterschied in der Fluoreszenzverteilung, gleichgültig, ob eine saure Aminosäure wie Glutamat, eine basische wie Arginin bzw. Lysin oder eine relativ lipophile Aminosäure wie Phenylalanin zum Einsatz kam. Daraus muß geschlossen werden, daß eine einzige zusätzliche Carboxylgruppe für die schnelle Exkretion in die Gallekanälchen ausreicht. Dies wird auch durch den Befund gestützt, daß sich Carboxyfluorescein in seinen Transporteigenschaften wie die FITC-Aminosäuren verhält.

Fehlt dagegen die zusätzliche Carboxylgruppe, so erhöht sich die Verweildauer bzw. die intrazelluläre Gesamtkonzentration des Farbstoffes. Beim Methylamin-FITC führte das lediglich zu einer moderaten Fluoreszenz der Monolayer, während es mit dem wesentlich lipophileren Benzylamin-FITC zu einer hellen, der des unveränderten Fluoresceins ähnlichen, intrazellulären Fluoreszenz kam. Der Grund dafür dürfte wiederum, wie bereits in Abschn. 4.2.2., S.68 ausgeführt, in einer veränderten Dissoziation des

Bindungsprotein-Liganden-Komplexes oder einer zwischengeschalteten Biotransformationsreaktion im sER zu sehen sein.

Darauf, daß u.a. die Lipophilie von Fremdstoffen für ihre Gallegängigkeit von großer Bedeutung ist, wird auch von Millburn (86) hingewiesen. Insofern sind die oben beschriebenen Befunde kaum verwunderlich. Der Vorteil der verwendeten Substanzen liegt jedoch darin, daß prinzipiell jedes beliebige Amin an die Isothiocyanatgruppe des FITC gekoppelt werden kann. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, mit einfachen Mitteln die Molekülstruktur eines lange anerkannten und genutzten Markers der biliären Sekretion (50) nahezu beliebig zu verändern und damit, in Verbindung mit dem Kultursystem, die Mechanismen und die Spezifität des Anionentransportes, auch ihrer Sekretion, zu untersuchen.

4.2.4. Die Hemmung des Gly-FITC-Transports

In vivo wird die NaK-ATPase an der basolateralen Seite der Hepatocyten vermutet (7,77,106,153). Sie sorgt durch einen kontinuierlichen Austransport von Natrium für einen in die Zelle gerichteten elektrochemischen Gradienten, der den Einstrom von Anionen, mit Natrium als Gegenion, ermöglicht (Natrium-Cotransport). Das gilt für Gallensäuren (für Review siehe Ref. 13); für andere organische Anionen wird es angezweifelt (87,109). Nun zeigt aber das unter 3.5.5.1., S. 52 und in Bild 24 dargestellte Ergebnis, daß die Aufnahme von Gly-FITC in die kultivierten Zellen nur bei der Anwesenheit von Natrium funktioniert. Durch den Austausch von Natriumchlorid gegen Cholinchlorid kann die Aufnahme total blockiert werden. Unter diesen Bedingungen fluoreszieren weder die Zellen noch die Gallekanälchen, was auch als ein Hinweis auf den

transzellulären Charakter des Gly-FITC-Transportes gewertet werden kann. Die Reversibilität der Hemmung wird dadurch bewiesen, daß die gleichen Zellen nach erneuter Zugabe von Natriumionen wieder zur Aufnahme des Farbstoffes fähig sind. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der von Minder und Paumgartner (87) beschriebenen Natriumunabhängigkeit der Aufnahme von Indocyanin Grün in isolierten Hepatocyten. Möglicherweise kann aus dieser Diskrepanz und aus einer Arbeit von Cornelius et al. (21), in der zwar ICG, nicht jedoch Na-Fluorescein für BSP kompetierten, auf die Existenz getrennter Aufnahmemechanismen für bestimmte Gruppen von organischen Anionen geschlossen werden. Auf Grund ihrer sehr starken Ladung könnten ICG und BSP, die beide Sulfonatgruppen in ihren Molekülen enthalten, als eine solche Gruppe weniger stark geladenen Farbstoffen wie z.B. Fluorescein und Bilirubin, gegenübergestellt werden. In einem solchen Kontext könnte auch die stärkere Ladung der FITC-Aminosäuren gegenüber dem Fluorescein gesehen werden.

Wenn jedoch die Aufnahme des Gly-FITC von einem einwärts gerichteten Natriumgradienten abhängt, dann müßte sie ebenfalls durch Ouabain, einen spezifischen Inhibitor der NaK-ATPase, hemmbar sein, analog den Versuchen in vivo, in denen eine Reduktion des gallensäureunabhängigen Galleflusses durch Ouabain und andere Hemmstoffe des Natriumtransportes festgestellt werden konnte (33). Auch konnte die Sekretion von Fluorescein in Monolayerkulturen von Rattenhepatocyten durch die Zugabe von Ouabain blockiert werden (42). Der Grund, warum der Gly-FITC-Transport in Anwesenheit von Ouabain dennoch funktioniert (vergl. Abschn. 2.9.1., S.36), kann verschiedene Gründe haben. Der wahrscheinlichste ist, daß die eingesetzte

Menge des Farbstoffes gegenüber früheren Versuchen (42) so hoch war, daß eine geringe Restaktivität der NaK-ATPase, die auch bei hohen Konzentrationen von Ouabain noch vorhanden sein dürfte, ausreicht, um genügend Farbstoff in die Zellen gelangen zu lassen. Die relativ hohe Farbstoffkonzentration wurde verwendet, um eine gute fotografische Qualität der Fluoreszenzbilder zu erreichen.

Eine zweite Ursache mag in der Tatsache liegen, daß Ouabain selbst choleretisch wirken kann (13). Als Pharmakon wird es via Galle aus dem Organismus eliminiert und kann, wie es auch von anderen Fremdstoffen vermutet wird, den gallensäureunabhängigen Gallefluß über osmotische Effekte stimulieren (32).

Drittens könnte neben einer aktiven, von Natrium abhängigen Aufnahme eine passive Diffusion des Farbstoffes eine Rolle spielen, die durch eine Verringerung der freien Konzentration vermittels intrazellulärer Bindungsproteine erleichtert würde. Insbesondere bei Zellen, die mit Phenobarbital kultiviert wurden, ist dieser Aspekt nicht zu vernachlässigen, da Ligandin durch Phenobarbital um den Faktor 2-2,5 induziert werden kann (2). Die passive Aufnahme ist aber nicht sehr wahrscheinlich, da eine solche auch in Natrium-freiem Medium zu beobachten sein müßte.

Die gleichzeitige Inkubation der Kulturen mit Gly-FITC und Fluorescein-Amin, das unter den Versuchsbedingungen selbst nicht fluoresziert, führte zu einem überraschenden Ergebnis. Der Farbstoff wurde zwar in die Zellen aufgenommen, jedoch nicht in die Gallekanälchen weitertransportiert (vergl.Abschn. 3.5.5.3., S.52/53 und Bild 25). Diese Behandlung resultierte

in einer hell fluoreszierenden Monolayer, wie sie sonst nur mit Fluorescein selbst, oder mit einem lipophilen FITC-Derivat erhalten werden konnte. Trotz der ähnlichen Molekülstruktur des Gly-FITC und des Fluoresceinamins, ist eine kompetitive Hemmung eher unwahrscheinlich, da bereits ein relativ geringer Überschuß des Amins genügte, um die Fluoreszenz in den Gallekanälchen beträchtlich zu reduzieren und das Gly-FITC intrazellulär anzuhäufen. Bei einem 5-fachen Überschuß des Amins war die Exkretion total blockiert; es konnten überhaupt keine fluoreszierenden Gallekanälchen entdeckt werden. Dieser Alles- oder Nichts-Effekt ist bei der sonstigen Heterogenität der kultivierten Hepatocyten, vor allem was den Status der einzelnen Gallekanälchen betrifft, besonders frappierend. Der Mechanismus der oben beschriebenen Hemmung, die durch nachfolgendes Entfernen des Amins aus dem Inkubationsmedium aufgehoben werden konnte, ist nicht klar.

Auf Grund der Resultate, die sich bei den verschiedenen Hemmversuchen ergaben, lassen sich wichtige Rückschlüsse für den Gesamttransport von Gly-FITC in den Hepatocytenkulturen ziehen.

- Für die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen sind Natriumionen notwendig.
- Die Exkretion des Farbstoffes kann reversibel gehemmt werden.
- Es existieren getrennte Carrier für den Eintransport und die Ausscheidung des Farbstoffes.

Um die Prozesse genauer zu charakterisieren, müssen jedoch weitere Versuche unternommen werden. So kann z.B. die Frage untersucht werden, welche effektive Konzentration an Natrium

notwendig ist, um die Aufnahme des Gly-FITC zu stoppen, ob die Aufnahme kompetitiv gehemmt werden kann, z.B. mit BSP, ICG oder Bilirubin usw..

4.2.5. Sucrosebehandlung

Ein weiterer Punkt, der zur Interpretation des Gly-FITC-Transportes herangezogen werden kann, ist das Entleeren der Gallekanälchen, wenn die Zellen mit einer hypertonen Sucroselösung behandelt werden (vergl. Abschn. 3.5.4., S. 51 und Bild 22 und 23). Damit konnte gezeigt werden, daß es sich tatsächlich um eine Konzentrierung des Farbstoffes in den als Gallekanälchen angesprochenen Strukturen und um einen transzellulären Transport handelt. Die Frage, ob eine Anreicherung von Gly-FITC möglicherweise parazellulär (12) zustande gekommen sei, infolge etwa undichter tight junctions und/oder auf Grund spezifischer Affinitäten zu in den Gallekanälchen befindlichen Proteinen o.ä., ist zu verneinen. Diese Argumentation wird unterstützt durch die Ergebnisse der Hemmversuche. Würde der parazelluläre Weg eine Rolle spielen, dann müßte sowohl in Natriumfreiem Medium als auch bei der Anwesenheit von Fluoresceinamin, eine Anreicherung des Farbstoffes in den Gallekanälchen stattfinden.

Die fluoreszierenden Säume, die nach dem Entleeren der Gallekanälchen an deren Ränder zurück bleiben, könnten mit einer besonderen Affinität des Farbstoffes zur luminalen Begrenzung der Canaliculi, etwa zur Glycocalix, erklärt werden. Sie lassen sich aber auch mit der Hypothese eines schnellen Austransports in Einklang bringen. Auslaufendes Gly-FITC passiert nach dem Durchtritt durch die tight junction-Region

den Interzellularspalt, wird an der dem Medium zugewandten, "sinusoidalen" Seite der Zellen wieder aufgenommen und erneut transzellulär in die Gallekanälchen transportiert.

4.2.6. Die Stimulierung des Gly-FITC-Transports durch Phenobarbital

Phenobarbital wird u.a. zur Therapie der intrahepatischen Cholestase eingesetzt (145,151). In diesem Zusammenhang sind besonders zwei Wirkungen des Medikaments hervorzuheben, die jedoch nicht in unmittelbarem Zusammenhang miteinander zu stehen scheinen. Einerseits führt Phenobarbital zu einem vermehrten Auftreten von tetrahydroxylierten Gallensäuren, welche gegenüber den normalen Gallensäuren bevorzugt renal ausgeschieden werden (4). Die verstärkte Hydroxylierung dürfte in Verbindung mit der Induktion des Cytochroms P-450 zu sehen sein, die sich in einer biochemisch meßbaren Zunahme der Enzymaktivität ausdrückt und mit einer Hypertrophie des sER einhergeht (142). Die zweite Wirkung betrifft eine Stimulierung des gallensäureunabhängigen Galleflusses, der mit einer Induktion der NaK-ATPase korrelierbar ist (Übersicht in Ref. 32).

In der vorliegenden Arbeit wurde Phenobarbital deshalb eingesetzt, weil es vom mikroskopischen Eindruck her die Ausbildung der Gallekanälchen in der Kultur unterstützt, was sowohl strukturelle wie auch sekretorische Aspekte einschließt. Die strukturelle Entwicklung und der Einfluß des Phenobarbitals auf die NaK-ATPase wurde von Klose (70) näher untersucht.

Was die Sekretion von Fluoreszenzfarbstoffen anbetrifft, so war ein eindrucksvoller Unterschied zwischen mit Phenobar-

bital behandelten und nicht behandelten Kulturen zu verzeichnen (vergl. Abschn. 3.5.3.,S.50 und Bild 21). Die im Phasenkontrastbild erkennbare Dilatation der Gallekanälchen ist möglicherweise eine Folge vermehrter Sekretion, die über einen erhöhten luminalen Druck zur Erweiterung der Canaliculi führen könnte. Die starke Lichtbrechung wäre der optische Ausdruck flüssigkeitserfüllter Gallekanälchen.

Eine verstärkte Sekretion ist im Falle der Fluoreszenzfarbstoffe offenkundig. Es liegt nahe zu vermuten, daß dabei die Stimulierung der NaK-ATPase durch Phenobarbital (32) eine Rolle spielt. Allerdings muß auch die Tatsache in Betracht gezogen werden, daß unter Phenobarbital die Menge an Ligandin beträchtlich erhöht ist (2). Damit stelltsich wiederum die Frage, inwieweit die NaK-ATPase bzw. die Existenz intrazellulärer Bindungsproteine für die Aufnahme der organischen Anionen in die Zelle von Bedeutung sind (vergl.Abschn. 4.2.1., S.66). Sicher ist, daß Phenobarbital auch in der Hepatocytenkultur einen beachtenswerten Einfluß auf den biliären Transport ausübt. Möglicherweise läßt sich dieses experimentelle System zur Untersuchung des Angriffsortes von Phenobarbital ausnutzen.

4.3. Die Monolayerkultur als Modellsystem zur Untersuchung der biliären Polarität

Das Auftreten von gallekanälchenartigen Strukturen wurde von Beginn an mit der Frage verknüpft, inwieweit in dieser strukturellen Membrandifferenzierung eine tatsächliche, wiedergewonnene biliäre Polarität der kultivierten Hepatocyten zu sehen sei. Mit rein morphologischen Beschreibungen, ob z.B. eine Orientierung des Golgi-Apparates zu den Canaliculi besteht (150) oder nicht (19), läßt sich das nicht beantworten. Allerdings erschienen erst in jüngster Zeit die ersten Arbeiten, in denen die Frage auch nach der funktionellen Integrität der neugebildeten Gallekanälchen zum Gegenstand der Untersuchungen gemacht wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen in wesentlichen Teilbereichen zu einer biliären Sekretion befähigt sind. Fast gleichzeitig erschienen die Arbeiten von Barth und Schwarz (6) und Gebhardt und Jung (42) über den transzellulären Transport des organischen Anions Fluorescein; Gebhardt (40) und Jones (59) untersuchten die Aufnahme und Sekretion von Immunglobulin A in Hepatocytenkulturen, wobei insbesondere von Gebhardt (40) gezeigt wurde, daß sich fluoreszenzmarkiertes IgA in den gleichen Strukturen wiederfindet, in die auch das Fluorescein sezerniert wird. Bezüglich eines anderen wichtigen Bereiches der biliären Sekretion, nämlich der der Gallensäuren, liegen bisher keine Beweise darüber vor, ob eine Sekretion in die Gallekanälchen erfolgt. Zwar konnten sowohl Scharschmidt und Stephens (125) wie auch Galivan (38) zeigen, daß eine Konzentrierung von extern angebotenem Taurocholat in kultivierten Hepatocyten stattfindet,

über eine Sekretion der radioaktiv markierten Gallensäure wurde jedoch nicht berichtet. Wirthensohn und Barth (152) wiesen an Hand von Radio-Immuno-Assays nach, daß Hepatocytenkulturen zur Produktion von Gallensäuren in der Lage sind, die zugrundeliegenden Messungen differenzierten jedoch nicht zwischen Gallensäuren, die ins Kulturmedium abgegeben worden waren und jenen, die intrazellulär akkumulierten. Insgesamt also ist die Frage, ob Gallensäuren in den neugebildeten Gallekanälchen angereichert werden oder nicht, noch offen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse bezüglich des Taurolithocholats sprechen eher für die Annahme, daß auch ein solcher Transport in den Kulturen möglich ist. Zumindest muß TLC zum Gallepol gelangen, anderenfalls wären die gefundenen ultrastrukturellen Veränderungen der canaliculären Membran nicht zu erklären. Der direkte Nachweis einer Sekretion von Gallensäuren in die Canaliculi steht allerdings noch aus.

Organische Anionen unterliegen nicht, wie Gallensäuren, einem enterohepatischen Kreislauf. Sie werden auch nicht in der Leber selbst sythetisiert, sondern ausschließlich über den Blutweg an das Organ herangeführt, sinusoidal aufgenommen, intrazellulär modifiziert und biliär sezerniert. Möglicherweise liegt darin der Grund, daß in der Monolayerkultur von Hepatocyten, trotz des Fehlens einer Abflußmöglichkeit für die Galle, der Transport von organischen Anionen so gut funktioniert. Die Kultur eignet sich deshalb und nicht zuletzt wegen ihrer einfachen experimentellen Handhabbarkeit besonders zur Untersuchung der diesem Transport zugrunde liegenden Mechanismen.

Zur Untersuchung der biliären Polarität von kultivierten Hepatocyten müssen auch die Arbeiten gerechnet werden, die sich

den ultrastrukturellen und cytochemischen Aspekten der Neuausbildung von Gallekanälchen widmen. Dazu gehören die Publikationen von Robenek et al. (117) über die Formation von tight junctions, von Gebhardt et al. (44) über die Rolle des Cholesterins bei der Entstehung neuer Gallekanälchen und von Jung et al. (61) über die Lokalisation membrangebundener Phosphatasen in den Kulturen.

Diese Arbeiten und die vorliegende Dissertation beweisen, daß sich die Hepatocytenkulturen zur Untersuchung der biliären Polarität einsetzen lassen und auch in steigendem Maße eingesetzt werden. Es konnten so bereits Erkenntnisse gewonnen werden, die mit anderen experimentellen Systemen schwer oder gar nicht zugänglich gewesen wären. Zum Beispiel konnte die Rolle des Cholesterins bei der Formation von tight junctions (117), bei der Entstehung der Gallekanälchen (44) und bei der TLC-Cholestase (62) mit Hilfe der Monolayerkultur besser aufgeklärt werden als in der perfundierten Leber, da es in der einzelligen Schicht keine Penetrationsprobleme für Filipin gibt; die Anwendung von toxischen Substanzen wie Vinblastin (41) läßt sich in der Kultur leichter verwirklichen als z.B. im Ganztier, wo neben den gewünschten Organen auch der Gesamtorganismus in Mitleidenschaft gezogen wird; die Untersuchungen können an wesentlich größeren "Populationen" von Kulturschalen durchgeführt werden als mit Ganztieren oder perfundierten Lebern, wobei sogar von relativ einheitlichem Zellmaterial ausgegangen werden kann, um nur einige Vorteile des Kultursystems zu nennen.

Ein wesentlicher Nachteil ist in dem Fehlen eines biliären Gefäßsystems und des enterohepatischen Kreislaufes zu sehen,

was vor allem für die Untersuchung von Gallensäuremetabolismus und -sekretion von Bedeutung sein dürfte; darauf wurde bereits weiter oben eingegangen. Einige Anzeichen, daß die Zellen alleine auf Grund der Kulturbedingungen in gewisser Hinsicht cholestatisch sein könnten, wie z.B. der spontane Anstieg der alkalischen Phosphatase und das ultrastrukturelle Erscheinungsbild einiger Gallekanälchen (61) dürften damit in Zusammenhang stehen. Als weiterer Nachteil kann die Tatsache aufgefaßt werden, daß die Ausbildung der Gallekanälchen u.a. auch von den Kulturbedingungen abhängt, was sich andererseits aber auch zum Vorteil ausnutzen läßt. Die Rückbildung bereits vorhandener Gallekanälchen nach ein paar Kulturtagen ist ebenfalls ein interessantes Phänomen, deren Ursachen bisher im Dunkeln liegen. Insgesamt muß jedoch gesagt werden, daß die Hepatocytenkultur eine gute Ergänzung zu den etablierten experimentellen Systemen darstellt, an denen bisher Mechanismen der Gallebildung und -sekretion und der intrahepatischen Cholestase untersucht wurden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung von Mechanismen des Transportes organischer Anionen in der Hepatocytenkultur wurden Modellsubstanzen synthetisiert, die als Derivate des Fluoresceins, eines anerkannten Markers der biliären Sekretion, angesprochen werden können. Zwischen dem Fluorescein selbst und den verschiedenen Derivaten waren Unterschiede im Transportverhalten festzustellen, die auf Veränderungen in der molekularen Struktur zurückgeführt werden:

- Fluorescein wird innerhalb von wenigen Minuten in die Zellen aufgenommen und nachfolgend in die Gallekanälchen sezerniert. Die intrazelluläre Konzentration bleibt dabei so hoch, daß eine deutliche Fluoreszenz der Monolyer wahrgenommen werden kann.
- Gly-FITC und andere Aminosäurederivate des Fluoresceinisothiocyanats werden ähnlich schnell aufgenommen wie das Fluorescein, jedoch ist ihre intrazelluläre Konzentration nicht ausreichend, um als Fluoreszenz der Monolayer wahrnehmbar zu sein. Es wird vermutet, daß die Exkretion dieser Farbstoffe wesentlich schneller ist als ihre Aufnahme.
- Durch die Erhöhung der Lipophilie, z.B. durch Kopplung von Benzylamin statt einer Aminosäure, kann die Verweildauer der Farbstoffe und damit ihre Konzentration in den Zellen erhöht werden. Es wird angenommen, daß die Notwendigkeit, die Lipophilie durch Biotransformation zu reduzieren, und/oder eine veränderte Affinität an intrazelluläre Bindungsproteine wie Ligandin, für dieses Phänomen verantwortlich ist.

Allgemein zeigt der Anionentransport in kultivierten Hepatocyten folgende Eigenschaften:

- Der Transport der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt transzellulär.
- Die Farbstoffe werden in einem biliären Kompartiment angereichert, das den Gallekanälchen in vivo äquivalent ist. Durch Behandlung der Zellen mit einer hypertonen Sucroselösung kann diese Anreicherung aufgehoben werden.
- Für die Aufnahme der Anionen sind Natriumionen notwendig. Sie kann durch Entzug von Natriumchlorid reversibel gehemmt werden.
- Die Sekretion der Farbstoffe in die Gallekanälchen ist reversibel hemmbar. Von dieser Hemmung bleibt die Aufnahme unbeeinflußt. Daraus wird gefolgert, daß für die Aufnahme und für die Exkretion organischer Anionen getrennte, Carrier-vermittelte Mechanismen existieren.
- Die Sekretion der Farbstoffe kann durch Agenzien, die in vivo choleretisch wirken, z.B. durch Phenobarbital, stimuliert werden.

Mit Hilfe von Taurolithochclat (TLC) und Chlorpromazin (CPZ) konnten in der Kultur ultrastrukturelle Veränderungen erzeugt werden, die jenen in der TLC- und der CPZ-Cholestase in vivo vergleichbar sind.

TLC entfaltete seine Wirkung besonders im Bereich der Gallekanälchen. Einerseits kam es zu einer für die TLC-Cholestase typischen lamellären Transformation der canaliculären Membran, bei anderen Gallekanälchen führte die Behandlung zu einer

starken Dilatation. Die Anwendung des Polyenantibiotikums Filipin, eines spezifischen cytochemischen Cholesterinmarkers, ergab eine starke Anhäufung von Cholesterin sowohl in den Membranen als auch in den Lumina der dilatierten Gallekanälchen, während die glatten Membranen der lamellär transformierten Canaliculi frei von Cholesterin und Intramembranpartikeln waren. Intrazelluläre Organellen waren von der Wirkung des TLC nur wenig betroffen.

Unter dem Einfluß von CPZ kam es zu einer mehr allgemeinen Schädigung der zellulären Membranen. Kurzzeiteffekte, die bereits nach 30 Minuten sichtbar waren, umfaßten eine Dilatation des rER und der Kernmembran, sowie eine Verschiebung und/oder Extraktion von Intramembranpartikeln der Plasmamembran. Eine längere Einwirkung der Droge (24 bis 48 Stunden) führte zur Divertikulation von Gallekanälchen und zu einer dramatischen Anhäufung von Autophagosomen, die myelinartig aufgewickeltes, membranöses Material enthielten.

6. Literaturverzeichnis

1. Alvares, A.P. (1982) in: The Liver, Biology and Pathobiology (Arias, I., Popper, H., Schachter, D. & Shafritz, D.A., eds.) S. 265-280, Raven Press, New York.
2. Arias, I.M., Fleischner, G., Listowsky, I., Bhrgava, M., Kamisaka, K. & Gatmaitan, Z. (1977) in: Liver and Bile (Bianchi, L. Gerok, W. & Sickinger, K.,eds.) S. 157-166, MTP-Press, Lancaster.
3. Arias, I.M., Fleischner, G., Listowsky, I.,Kamisaka, K., Michkin, S. & Gatmaitan, Z. (1975) in: The Hepatobiliary Sytem (Taylor, W., ed.) S. 81-103, Plenum Press,New York.
4. Back, P. (1982) Klin. Wochenschrift 60, 541-549.
5. Balázs, M. & Juházs, J. (1975) Exp. Pathol.(Jena) 11, 25-37.
6. Barth, C.A. & Schwarz, L.R. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4985-4987.
7. Blitzer, B.L. & Boyer, J.L. (1978) J. Clin. Invest. 62, 1104-1108.
8. Blitzer, B.L. & Boyer, J.L. (1982) Gastroenterol. 82, 346-357.
9. Bonvicini, F., Gautier, A., Gardiol, D. & Borel, G.A. (1978) Lab. Invest. 38, 487-495.
10. Boyd, G.S. & Percy-Robb, I.W. (1971) Am. J. Med. 51, 580-587.
11. Boyer, J.L. (1980) in: Communications of Liver Cells (Popper,H., Bianchi, L., Gudat, F. & Reutter, W., eds.) S. 177-183, MTP-Press, Lancaster.
12. Boyer, J.L. (1980) in: Hepatology, Rapid Literature Review VI-1980, IX-XIII, Falk Foundation, Freiburg.
13. Boyer, J.L. (1980) Physiol. Reviews 60, 303-326.
14. Boyer, J.L., Itabashi, M. & Hruban, Z. (1979) in: The Liver, Quantitative Aspects of Structure and Function (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) S. 163-178, Editio Cantor, Aulendorf.
15. Boyer, J.L., Layden, J.T. & Hruban, Z. (1977) in: Membrane Alterations as Basis of Liver Injury (Popper, H., Bianchi, L. & Reutter, W., eds.) S.353-369, MTP-Press, Lancaster.
16. Branton, S., Bullivant, S., Gilula, N., Karnovsky, M., Moor, H., Mühlethaler, K., Northcote, D.H., Packer, L., Satir, B., Satir, P., Speth, V., Staehlin, L.A., Steere, R.L. & Weinstein, R.S. (1975) Science 190, 54-56.

17. Bruni, C. & Porter, K.R. (1965) Am. J. Pathol. 46, 691-755.
18. Carey, M.C., Hirom, P.C. & Small, D.M. (1976) Biochem. J. 153, 519-531.
19. Chapman, G.S., Jones, A.L., Meyer, U.A. & Bissel, D.M. (1973) J.Cell Biol. 59, 735-747.
20. Coleman, R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 1-30.
21. Cornelius, C.A., Ben-Ezzer, J. & Arias, I.M. (1967) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124, 665-667.
22. Danielsson, H. (1976) in: The Hepatobiliary System (Taylor, W., ed.) S. 389-407, Plenum Press, New York.
23. Danielsson, H, & Gustafsson, J. (1981) Pathobiology Annual 11, 259-299.
24. Davis, A.R., Kern, F. jr., Showalter R., Sutherland, E., Sinensky, M. & Simon, F.R. (1978) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4130-4134.
25. De Vos, R. De Wolf-Peeters, C., Desmet, V., Bianchi, L. & Rohr, H.P. (1975) Exp. Mol. Pathol. 23, 12-34.
26. Demet, V. (1975) in: Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Teodori, U., Gorini, S. & Popper, H., eds.) S. 7-23, Raven Press, New York.
27. Desmet, V.J. (1977) in: Liver and Bile (Bianchi, L., Gerok, W. & Sickinger, K., eds.) S. 3-31, MTP-Press, Lancaster.
28. Dioguardi, N., Ideo, G. &Chiesara, E. (1975) in: Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Teodori, U., Gorini, S. & Popper, H.,eds.) S. 141-151, Raven Press, New York.
29. Dubin, M. Maurice, M. & Feldmann, G. (1980) Gatroenterol. 79, 646-654.
30. Elias, P.M., Friend, D.S. & Goerke, J. (1979) J. Histochem. Cytochem. 27, 1247-1260.
31. Erlinger, S., Glasinović, J.C., Poupon, R. & Dumont, M. (1975) in: The Hepatobiliary System (Taylor, W., ed.) S.433-447, Plenum Press, New York.
32. Erlinger, S. (1982) in: The Liver, Biology and Pathobiology (Arias, I., Popper, H., Schachter, D. & Shafritz, D.A., eds.) S.407-427, Raven Press, New York.
33. Erlinger, S., Dhumeaux, D. & Benhamou, J.P. (1969) Nature 223, 1276-1277.

34. Faulstich, H. Wieland, T.H., Schimassek, H., Walli, A.K. & Ehler, N. (1977) in: Membrane Alterations as Basis of Liver Injury (Popper, H., Bianchi, L. & Reutter, W.,eds.) S. 301-310, MTP-Press, Lancaster.
35. Fleischmann, R. & Remmer, H. (1979) in: Problems in Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P.,Popper, H., Sherlock, S. & Teodori, U., eds.) S. 93-101, Karger, Basel.
36. Forker, E.L. (1977) Ann. Rev. Physiol. 39, 323-347.
37. Friend, D.S. (1982) J. Cell Biol. 93, 243-249.
38. Galivan, J. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 850-852.
39. Gebhardt, R. (1980) Dissertation, Universität Tübingen.
40. Gebhardt, R. (1983) Gastroenterol., im Druck.
41. Gebhardt, R. (1983) Exp. Cell Res., im Druck.
42. Gebhardt, R. & Jung, W. (1982) J.Cell Sci. 56, 233-244.
43. Gebhadrt, R. & Mecke, D. (1979) Exp. Cell Res. 124, 349-359.
44. Gebhardt, R., Jung, W. & Robenek, H. (1982) Eur. J. Cell Biol. 29, 68-76.
45. Gentilini, P., Surrenti, C. Salvadori, G., Chiarantini, E., Masi, R., Buzzelli, G. & Casini, M.C. ((1975) in: Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Teodori, U., Gorini, S. & Popper, H., eds.) S. 41-57, Raven Press, New York.
46. Goresky, C.A. (1964) Am. J. Physiol. 207, 13-26.
47. Goresky, C.A. (1982) in: The Liver, Biology and Pathobiology (Arias, I., Popper, H, Schachter, D. & Shafritz, D.A., eds.) S. 581-599, Raven Press, New York.
48. Graf, J. & Peterlik, M. (1975) in: The Hepatobiliary System (Taylor, W., ed.) S. 43-58, Plenum Press, New York.
49. Greim, H., Trülzsch, D., Roboz, J., Dressler, K., Czygan, P., Hutterer, F., Schaffner, F. & Popper, H. (1972) Gastronterol. 63, 837-845
50. Hanzon, V. (1952) Acta Physiol. Scand. 28 (suppl.), 101, 1-268.
51. Hardison, W.G.M. & Wood, C.A. (1978) Am. J. Physiol. 235, E158-164.
52. Haslewood, G.A.D. (1978) The Biological Importance of Bile Salts. Frontiers of Biology, Vol. 47 (Neuberger, A. & Tatum, E.L., eds.) North Holland, Amsterdam.
53. Hofmann, A.F. (1980) in: Communications of Liver Cells (Popper, H., Biachi,L., Gudat, F. & Reutter, W., eds.) S. 43-49, MTP-Press, Lancaster.

54. Hruban, Z., Tavoloni, N., Reed, J.S. & Boyer, J.L. (1978) Virchows Arch. B, Cell Pathol. 26, 289-305.
55. Ideo, G., Morganti, A. & Dioguardi, N. (1972), Digestion 5, 326-336.
56. Javitt, N.B. (1966) Nature 210, 1262-1263.
57. Javitt, N.B., Dillon, D. Kok, E & Wachtel, N. (1979) in: The Liver. Quantitative Aspects of Structure and Funtion (Preisig, R. & Bircher, J., eds.) S. 197-202, Editio Cantor, Aulendorf.
58. Javitt, N.B. (1980) in: Communications of Liver Cells (Popper, H., Biachi, L., Gudat, F. & Reutter, W., eds.)S.69-74, MTP-Press, Lancaster.
59. Jones, A.L., Huling, S., Hradek, G.T., Gaines, H.S., Christiansen, W.D. & Underdown, B.J. (1982) Hepatology 2, 769-776.
60. Jung, W. (1980) Diplomarbeit, Universität Tübingen.
61. Jung, W., Gebhardt, R. & Mecke, D. (1982) Eur. J. Cell Biol. 27, 230-241.
62. Jung, W.,Gebhardt, R. & Robenek, H. (1982) Eur. J. Cell Biol. 29, 77-82.
63. Kakis, G., Phillips, J. & Yousef, I.M. (1980) Lab. Invest. 43, 73-81.
64. Kakis, G. & Yousef, I.M. (1980) Gastroenterol. 78, 1402-1411.
65. Keefe, E.B., Blankenship, N.M. & Scharschmidt, B.F. (1980) Gastroenterol. 79, 222-231.
66. Kern, F., jr., Eriksson, H., Curstedt, T. & Sjövall, J. (1977), J. Lipid. Res. 18, 623-634.
67. King, J.E. & Schoenfield, L.J. (1971) J. Clin. Invest. 50, 2305-2312.
68. Kinsky, S.C., Demel, R.A. & Van Deenen, L.L.M. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 835-843.
69. Kinsky, S.C., Luse, S.A., Zopf, D. Van Deenen, L.L.M. & Haxby, J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 844-861.
70. Klose, U. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen.
71. Klose, U., Gebhardt, R., Robenek, H. & Jung, W. (1982) Basel Liver Week 1982, Poster Nr. 54, Bile Acids and Cholesterol in Health and Desease.
72. Kostner, G.M., Laggner, P., Prexel, H.J. & Holasek, A. (1976) Biochem. J. 157, 401-407.

73. Kramer, W., Bickel, U., Buscher, H.P., Gerok, W. & Kurz, G. (1982) Eur. J. Biochem. 129, 13-24.
74. Kramer, W., Buscher, H.P., Gerok, W. & Kurz, G. (1979) Eur. J. Biochem. 102, 1-9.
75. Lambiotte, M. (1977) in: Bile Acid Metabolism in Health and Desease (Paumgartner, G. & Stiehl, A., eds.) S. 33-47, MTP-Press, Lancaster.
76. Lambiotte, M., Vorbrodt, A. & Benedetti, E.L. (1973) Cell Differentiation 2, 43-53.
77. Latham, P.S. & Kashgarian, M. (1979) Gastroenterol. 76, 988-996.
78. Layden, T.J. & Boyer, J.L. (1977) Gastroenterol. 73, 120-128.
79. Leevy, C.M., Smith, F., Longueville, J., Paumgartner, G. & Howard, M.M. (1967) J. Am. Med. Assoc. 200, 236-240.
80. Lemaître-Coelho, I., Jackson, G.D.F. & Vaerman, J.P. (1977) Eur. J. Immonol. 8, 588-590.
81. Liersch, M. & Stiehl, A. (1974) in: Advances in Bile Acid Research (Matern, S., Hackenschmidt, J., Back, P. & Gerok, W., eds.) S. 255-258, Schattauer Verlag, Stuttgart.
82. Manzato, E., Fellin, R., Baggio, G., Walch, S. Neubeck, W. & Seidel, D. (1976) J. Clin. Invest. 57, 1248-1260.
83. Mc Intire, N., Agorastos, J., Owen, J.S. & Harry, D.S. (1979) in: 2nd International Symposion on Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Popper, H., Sherlock, S. & Teodori, U., eds.) S. 116-120, Karger, Basel.
84. Metzler, H. (1982) Dissertation, Universität Tübingen.
85. Miettinen, A, Virtanen, I., & Linder, E. (1978) J. Cell Sci. 31, 341-353.
86. Millburn, P. (1975) in: The Hepatobiliary System (Taylor, W., ed.) S. 109-129, Plenum Press, New York.
87. Minder, E. & Paumgartner, G. (1977) Gastroenterol. 73, A-37/1235.
88. Miyai, K, Mayr, W.W. & Richardson, A.L. (1975) Lab. Invest. 32, 527-535.
89. Miyai, K., Price, V.M. & Fisher, M.M. (1971) Lab. Invest. 24, 292-302.
90. Miyai, K., Richardson, A.L., Mayr, M. & Javitt, N.B. (1977) Lab. Invest. 36, 249-258.

91. Montesano, R., Perrelet, A., Vassalli, P. & Orci, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6391-6395.
92. Myant, N.B. & Mitropoulos, K.A. (1977) J. Lipid Res. 18, 135-153.
93. Nemchausky, B.A.; Layden, T.J. & Boyer, J.L. (1977) Lab. Invest. 36, 259-267.
94. Norman, A.W., Demel, R.A., De Kruyff, B. & van Deenen, L.L.M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1918-1929.
95. Oda, M, Price, V.M. Fisher, M.M. & Phillips, M.J. (1974) Lab. Invest. 31, 314-323.
96. Orci, L., Montesano, R., Meda, P., Malaisse-Lagae, F., Brown, D., Perrelet, A. & Vassalli, P. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 293-297.
97. Orlans, E., Peppard, J., Reynolds, J. & Hall, J. (1978) J. Exp. Med. 147, 588-592.
98. Oshio, C. & Phillips, M.J. (1981) Science 212, 1041-1042.
99. Paumgartner, G. (1981) in: Hepatology. Rapid Literature Review 11/6, IX-XIII, Falk Foundation, Freiburg.
100. Perissel, B., Charbonné, F., Chessebeuf, M. & Malet, P. (1976) Cell Tissue Res. 171, 157-173.
101. Phillips, M.J., Oda, M., Mak, E. & Fisher, M.M. (1975) in: Jaundice (Fisher, M.M. & Goreski, C.A., eds.) S. 367-382, Plenum Press, New York.
102. Popper, H. (1968) Ann. Rev. Med. 19, 39.
103. Popper, H. (1977) in: Liver and Bile (Biachi,.L., Gerok, W. & Sickinger, K., eds.) S. 189-201, MTP-Press, Lancaster.
104. Popper, H. & Schaffner, F. (1970) Human Pathol. 1 , 1-24.
105. Popper, H. & Schaffner, F. (1975) in: Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Teodori, U, Gorini, S., & Popper, H., eds.) S. 25-40, Raven Press, New York.
106. Poupon, R.E. & Evans, W.H. (1979) FEBS Lett. 108, 374-378.
107. Rassat, J. (1982) Dissertation, Universität Münster.
108. Reichen, J. & Berk, P.D. (1980) in: Communications of Liver Cells (Popper, H., Bianchi, L., Gudat, F. & Reutter, W., eds.) S. 59-67, MTP-Press, Lancaster.
109. Reichen, J., Blitzer, B.L. & Berk, P.D. (1981) Biochim. Biophys. Acta 640, 298-312.
110. Reichen, J. & Paumgartner, G. (1976) Am. J. Physiol. 231, 734-742.

111. Reichen, J., Paumgartner, D.,Berk, P.D. & Paumgartner, G. (1979) in: Biological Effects of Bile Acids (Paumgartner, G., Stiehl, A. & Gerok, W., eds.) S. 25-26, MTP-Press, Lancaster.

112. Reimold, W.V., Hennings, M., Holtermann, M. & Kattermann, R. (1975) in: Advances in Bile Acid Research (Matren, S., Hackenschmidt, J., Back, P. & Gerok, W., eds.) S. 173-180, Schattauer Verlag, Stuttgart.

113. Renston, R.H., Jones, A.L., Cristiansen, W.D., Hradek, G.T. & Underdown, B.J. (1980) Science 208, 1276-1278.

114. Renston, R.H., Maloney, D.G., Jones, A.L., Hradek, G.T., Wong, K.Y. & Goldfine, I.D. (1980) Gastroenterol. 78, 1373-1388.

115. Robenek, H. (1983) in: Structural Carbohydrates of the Liver, MTP-Press, im Druck.

116. Robenek, H., Gebhardt, R. & Jung, W. (1982) in: Electron Microscopy 1982, Vol. 3 (Organizing Comittee of the 10th International Congress on Electron Microscopy, Hamburg 1982, eds.) S. 457-458, Offizin Paul Hartung, Hamburg.

117. Robenek, H., Jung, W. & Gebhardt, R. (1982) J. Ultrastr. Res. 78, 95-106.

118. Robinson, J.M. & Karnovsky, M.J. (1980) J. Histochem. Cytochem. 28, 161-168.

119. Ros, E., Small, D.M. & Carey, M.C. (1977) in: Bile Acid Metabolism in Health and Desease (Paumgartner, G. & Stiehl, A., eds.) S. 219-227, MTP-Press, Lancaster.

120. Rouiller, Ch. & Jézéquel, A.M. (1963) in: Charles Rouiller, The Liver. Microscopy, Biochemistry, Physiology. S. 195-264, Academic Press, New York.

121. Samuels, A.M. & Carey, M.C. (1978) Gastroenterol. 74, 1183-1190.

122. Sattler, C.A., Michalopoulos, G., Sattler, G.L. & Pitot, H.C. (1978) Cancer Res. 38, 1539-1549.

123. Schaffner, F., Bacchin, P., Hutterer, F., Scharnbeck, H., Sarkozi, L., Denk, H. & Popper, H. (1971) Gastroenterol. 60, 888-897.

124. Scharschmidt, B.F. & Schmid, R. (1978) J.Clin. Invest. 62, 1122-1131.

125. Scharschmidt, B.F. & Stephens, J.E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 986-990.
126. Scharschmidt, B.F., Waggoner, J.G. & Berk, P.D. (1976) in: The Liver. Quantitative Aspects of Structure and Function. (Preisig, R., Bircher, J. & Paumgartner, G., eds.) S. 135-141, Editio Cantor, Aulendorf.
127. Schirmer, G. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen.
128. Schirmer, G., Gebhardt, R. & Mecke, D. (1980) in: Communications of Liver Cells (Popper, H., Bianchi, L., Gudat, F. & Reutter, W., eds.) S. 355, MTP-Press, Lancaster.
129. Schmid, R. (1975) in: Jaundice (Fisher, M.M. & Goresky, C.A., eds.) S. 43-55, Plenum Press, New York.
130. Schmid, R. (1980) in: Communications of Liver Cells (Popper, H., Bianchi, L., Gudat, F. & Reutter, W., eds.) S. 51-57, MTP-Press, Lancaster.
131. Schmitt, F.W. (1977) in: Liver and Bile (Bianchi, L. Gerok, W. & Sickinger, K., eds.) S. 203-214, MTP-Press, Lancaster.
132. Schwarz, L.R., Burr, R., Schwenk, M., Pfaff, E. & Greim, H. (1975) Eur. J. Biochem. 55, 617-623.
133. Schwarz, L.R., Summer, K.H. & Schwenk, M. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 617-622.
134. Seidel, D. (1977) in: Liver and Bile (Bianchi, L., Gerok, W. & Sickinger, K., eds.) S. 215-221, MTP-Press, Lancaster.
135. Severs, N.J. & Robenek, H. (1983) Biochim. Biophys. Acta, zur Veröffentlichung eingereicht.
136. Severs, N.J., Warren, R.C. & Barnes, S.H. (1981) J. Ultrastr. Res. 77, 160-188.
137. Sheetz, M.P. & Singer, S.J. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4457-4461.
138. Shin, Y.C. (1978) Acta Anat. 100, 499-511.
139. Simon, F.R. & Arias, I.M. (1973) J. Clin. Invest. 52, 765-775.
140. Singer, S.J. (1974) Ann.Rev. Biochem. 43, 805-833.
141. Sperber, I. (1959) Pharm. Rev. 11, 109-134.
142. Stäubli, W., Hess, R. & Weibel,E.R. (1969) J. Cell Biol. 42, 92-112.

143. Stiehl, A., Cygan, P. & Götz, R. (1979) in: Problems in Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Popper, H., Sherlock, S. & Teodori, U., eds.) S. 70-74, S. Karger, Basel.

144. Tanikawa, K. (1979) Ultrastructural Aspects of the Liver and its Disorders. Sec. Ed. Igaku-Shoin, Tokyo.

145. Tanikawa, K. & Abe, H. (1979) in: Problems in Intrahepatic Cholestasis (Gentilini, P., Popper, H., Sherlock, S. & Teodori, U., eds.) S. 226, S. Karger, Basel.

146. Tiribelli, C., Lunazzi, G., Luciani, M., Panfili, E., Gazzin, B., Liut, G., Sandri, G. & Sottocasa, G. (1978) Biochim. Biophys. Acta 532, 105-112.

147. Tsao, S.C., Iga, T., Sugiama, Y. & Hanano, M. (1982) Biochem. Pharmacol. 31, 491-497.

148. Verkleij, A.J., De Kruijff, B., Gerritsen, W.F., Demel, R.A., Van Deenen, L.L.M. & Ververgaert, P.H.J. (1973) Biochim Biophys. Acta 291, 577-581.

149. Vial, J.D., Simon, F.R. & Mackinnon, A.M. (1976) Gastroenterol. 70, 85-92.

150. Wanson, J.L., Drochmans, P., Mosselmans, R. & Ronveaux, M.F. (1977) J. Cell Biol. 74, 858-877.

151. Wheeler, P. & Williams, R. (1977) in: Liver and Bile (Bianchi, L., Gerok, W. & Sickinger, K., eds.) S. 309-317, MTP-Press, Lancaster.

152. Wirthensohn, K. & Barth, C.A. (1982) Basel Liver Week 1982, Poster Nr. 42, Bile Acids and Cholesterol in Health and Desease.

153. Wisher, M.H. & Evans, W.H. (1975) Biochem. J. 146, 375-388.

Lebenslauf

Persönliches

Name:	Wilhelm Jung
Adresse:	Doblerstr. 16
	D-7400 Tübingen
Geboren:	27.11.1949, Monreal/Eifel
Verheiratet:	Christine Jung, geb. Würdemann, 16.7.1974
Kinder:	Katrin Elisabeth, 26.7.1980
	Andrea Martina, 21.4.1982

Werdegang

1966	Mittlere Reife (Realschule, Mayen/Eifel)
1966-1969	Ausbildung zum Biologielaboranten (BASF, Ludwigshafen/Rh.)
1972	Abitur (Jugenddorf-Christophorusschule, Altensteig/Schww.)
1972-1973	Pflichtwehrdienst
1973-1980	Studium der Biochemie (Universität Tübingen)
März 1980	Diplom; Diplomarbeit bei Prof.Dr.D.Mecke, Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Tübingen. Thema:"Untersuchungen zu Aktivitätsverlauf und ultrastruktureller Verteilung membrangebundener Phosphatasen in Kulturen von Leberparenchymzellen der Ratte".
April 1980 -März 1983	Doktorarbeit bei Prof.Dr.D.Mecke, Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Tübingen. Thema:" Primärkulturen von Rattenhepatocyten als Modellsystem zur Untersuchung der biliären Sekretion und der intrahepatischen Cholestase".

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Anatomie:	K. Mörike
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff
Botanik:	H. Metzner
Mikrobiologie:	V. Braun, H. Zähner
Organische Chemie:	E. Bayer, E. Müller, W. Voelter
Pharmakologie:	H. Remmer
Physik:	F. Gönnenwein
Physikalische Chemie:	H. Mauser, W. Zeil
Physiologie:	E. Betz
Physiologische Chemie:	D. Mecke, G. Weitzel
Zoologie:	K. G. Krell

B I L D A N H A N G

Bilder	1 - 9	Kontrollkulturen
Bilder	10 - 14	Taurolithocholat
Bilder	15 - 18	Chlorpromazin
Bilder	19 - 20	Anionentransport

Bild 1

Die Bildmitte zeigt eine Übersicht über mehrere Zellen der Monolayer. Die Interzellularspalte (Pfeilköpfe) haben eine konstante Weite von 150-200 Å. Mitochondrien (mi) und rauhes Endoplasmatisches Retikulum (rER) sind unregelmäßig über die Zellen verteilt. Einige Lipidtropfen (l) liegen ohne umgebende Membran im Cytoplasma. Die Zellen wurden mit Insulin (25 U/l) und Dexamethason (10^{-6}M) einen Tag lang kultiviert. ga = Golgi-Apparat.

oben links

Die "Sandwich-Struktur" des Desmosoms ist deutlich zu erkennen. Eine elektronendichte Schicht, von welcher sich filamentöses Material (Tonofilamente) ins Zellinnere hinein fortsetzt, liegt jeder der beiden beteiligten Plasmamembranen innen an. Die Mitte des Interzellularspaltes ist von einem feinen, elektronendichten Streifen markiert.

oben Mitte und oben rechts

Eine Doppelmembran umgibt die relativ elektronendichte Matrix der Mitochondrien, die einige dunkle Granula enthält und von Cristae durchzogen ist; die Cristae sind Auffaltungen der inneren Membran (Pfeilkopf). Häufig werden die Mitochondrien von rER umhüllt.

unten links

Ein großer Fetttropfen, der durch Verschmelzen kleinerer Lipideinschlüsse zustande gekommen ist, liegt ohne umhüllende Membran im Cytoplasma. In unmittelbarer Nachbarschaft sind ein VLDL-Vesikel (Pfeilkopf) und ein Peroxisom (Pfeil) zu sehen.

unten Mitte

Der hier dargestellte, für kultivierte Hepatocyten charakteristische Golgi-Apparat besteht aus 3-4 parallelen Zysternen und mehreren Vesikeln mit granulärem Inhalt. Eine Verbindung zum rER ist nicht zu erkennen.

unten rechts

Der elektronendichte "core" des Peroxisoms zeigt eine parallele Streifung, die selten in dieser Klarheit zu sehen ist.

Alle Maßstäbe, ausgenommen oben rechts, entsprechen 0,5 µm.

mi
ER
pg
1

Bild 2

unten

Der Interzellularspalt, der diese Zelle umgibt, ist weiter als der in Bild 1 und teilweise mit Mikrovilli durchsetzt. Schlauchartige, parallele Zysternen von rER füllen große Teile des Bildes. Die Zellen wurden 3 Tage mit Insulin (25 U/l) und Dexamethason (10^{-6}M) kultiviert und nach Trypsinablösung eingebettet.

oben links und oben Mitte

Lysosomen, von denen eines (Mitte) noch deutlich identifizierbare Mikrotubuli enthält, sind von einer einfachen Membran umgeben, die durch die Einwirkung von Filipin an manchen Stellen ein wellblechartiges Aussehen hat (Mitte). Andere Lysosomen sind mit elektronendichtem, nicht weiter abbaubarem Membranmaterial angefüllt (links).

oben rechts

Die Membran dieses VLDL-Vesikels ist stark korrugiert, was auf einen relativ hohen Cholesteringehalt schließen läßt; Lipoprotein-Partikel finden sich als runde bis ovale Gebilde im Innern des Vesikels.

Alle Maßstäbe geben eine Länge von 0,5 µm an.

0,5 µm
2

Bild 3

Es sind Kernstrukturen aus verschiedenen Perspektiven dargestellt. Die Übersicht oben links läßt die Umrisse des Kerns und des Nucleolus, der als elektronendichter Bezirk im Chromatin eingebettet ist, erkennen. Eine elektronendichte Schicht (Lamina) liegt der inneren Kernmembran direkt an (oben links, oben rechts und unten links). Die Doppelstruktur der Kernhülle ist in unregelmäßigen Abständen von Poren unterbrochen (Pfeilköpfe, oben rechts). Die Kernporen haben eine symmetrische Substruktur, die in dem tangentialen Kernanschnitt unten links und in dem Gefrierbruchbild unten rechts gut erkennbar ist: 8 Proteinkomplexe gleichen Durchmessers sind kreisförmig um einen zentralen Komplex angeordnet.
Die Maßstäbe zeigen 0,5 µm an.

3
0.5 µm

Bild 4

Der rechte obere Teil ist ein Ausschnitt der Plasmamembran einer isolierten Hepatocyte. Der Gefrierbruch erlaubt die Aufsicht auf die P-Seite (P), wo gleichmäßig zwischen den Intramembranpartikeln verteilte Filipin-Cholesterin-Komplexe ein kraterartiges Aussehen haben.

Die Mitte des Bildes demonstriert die Verteilung der Filipin-Cholesterin-Komplexe in der Plasmamembran einer Zelle am 4. Kulturtag. E-Seite (E) und P-Seite (P) der Lateralmembran sind zum überwiegenden Teil glatt, mit Ausnahme einer Akkumulation von Filipin-Cholesterin-Komplexen (Pfeilkopf), die möglicherweise Zeichen eines neu entstehenden Gallekanälchens ist. Der Übergang von der glatten lateralen Membran zu der mit Filipin-Cholesterin-Komplexen übersäten Zelloberseite (Stern), ist scharf. Nur in kleinen Vertiefungen der Zelloberfläche, die wahrscheinlich "coated pits" darstellen (Sterne, unten links), fehlen die Filipin-Cholesterin-Komplexe.
Die Maßstäbe bedeuten 0,5 µm.

4
P
C
E
P
E
P
0,6 µm

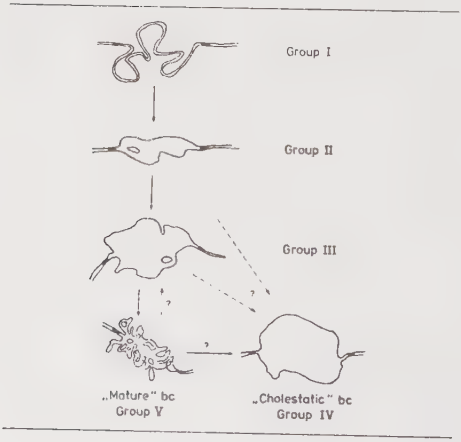
Bild 5

Der obere Teil des Phasenkontrastbildes zeigt eine Monolayer, die 20 Stunden mit Insulin (25 U/l) und Dexamethason (10^{-6}M) kultiviert wurde. Die Pfeilköpfe weisen auf Gallekanälchen, die in diesem Stadium lediglich vereinzelt als helle, scharfrandige Erweiterungen des Interzellularspaltes erkennbar sind, während am 4. Kulturtag viele Zellen gänzlich von solchen Strukturen umrundet sind (untere Hälfte; Kultivierung mit Glucagon, 10^{-6}M, Dexamethason, 10^{-6}und Trijodthyronin, 10^{-6}M, vom ersten Medienwechsel an; abgesetzt wurden die Zellen mit Insulin 25 U/l und Dexamethason, 10^{-6}M.
Beide Maßstäbe entsprechen 50 µm.

5

Bild 6

Es sind Formen von Gallekanälchen dargestellt, die alle in Kontrollkulturen angetroffen werden können. Je nach Entwicklungsstadium und funktionellem Status erscheinen sie als sacculäre (Mitte und unten rechts), oder als mehr mikrovillöse Strukturen (oben links und oben rechts), deren Lumina auch ganz mit Mikrovilli ausgefüllt sein können (unten links). Oftmals findet sich in den Lumina von sacculären Canaliculi membranöses Material (unten rechts), das reich an Cholesterin sein kann (korrugierte Membranrolle oben rechts, Pfeil). In der Regel sind zonolae occludentes als elektronendichte Kontaktzonen vorhanden, welche die Interzellularspalte abschließen (Pfeilköpfe). Ob jedoch ein Gallekanälchen vollständig von tight junctions umgeben ist, kann an Hand des Schnittbildes nicht entschieden werden.
Alle Maßstäbe bedeuten 1 µm.



Das hypothetische Schema, das aus Ref. 61 übernommen wurde, soll die verschiedenen canaliculären Strukturen verdeutlichen, die in einer Kontrollkultur auftreten können.

6
1 µm

Bild 7

Diese Zellen wurden nach 2 Tagen Kultivierung mit Insulin (25 U/l) und Dexamethason (10^{-6}M) eingebettet. Das Gallekanälchen ist so groß, daß es auch im Lichtmikroskop zwanglos als "Schlauch" erkannt werden könnte (vergl. Abschn. 3.2.1., S. 44). Das Lumen ist vielfach durch schmale Plasmasepten unterteilt, was auf die Verschmelzung von ursprünglich kleineren Strukturen hindeutet. Zwei kleinere Canaliculi sind oben rechts zu sehen(Pfeile). Insgesamt fünf Interzellularspalte münden in das Gallekanälchen ein; sie sind durch Pfeilköpfe markiert.

unten links

Das pericanaliculäre Plasma des Gallekanälchens ist von Vesikeln unterschiedlicher Größe durchsetzt, die möglicherweise von einem Golgi-Apparat (ga) stammen. Tight junctions sind als Verengung des Interzellularspaltes mit distinkten Berührungspunkten der lateralen Membranen zu erkennen.
Beide Maßstäbe bezeichnen 1 µm.

7
gs
m

Bild 8

Im Gefrierbruch kann man den Grad der tight junction-Formation, die mit der Ausbildung der Gallekanälchen in Zusammenhang steht (vergl. Ref. 44), sehr gut beurteilen. Die Partikel, aus welchen die Stränge zusammengesetzt sind, bilden auf der P-Seite (P) Erhebungen (obere Bildhälfte)und auf der E-Seite (E) Vertiefungen (untere Bildhälfte). An manchen Stellen verläuft der Bruch entlang eines tight junction-Stranges, sodaß der Übergang von der E- in die P-Seite erkennbar wird (Pfeile). Die Pfeilköpfe deuten auf Mikrovilli, die im unteren Bildteil reichlich im Lumen des Gallekanälchens vorhanden sind. Intramembranpartikel treten als kleine Erhebungen aus der Membranebene hervor; auf der P-Seite (P) sind sie zahlreicher vorhanden als auf der E-Seite (E).

Beide Maßstäbe entsprechen 0,5 µm.

8
P
E
P
0,5 µm

Bild 9

Es ist ein Canaliculus dargestellt, der vollständig von tight junction-Strängen umgeben ist. Die Kanälchenmembran ist zum großen Teil aufgebrochen, sodaß der Blick ins Lumen freigegeben wird. Dort befinden sich einige Mikrovilli (Pfeile) und oben links ein cholesterinreicher Vesikel (Stern). Auf der lateralen Membranseite sind unregelmäßig Filipin-Cholesterin-Komplexe verteilt (Kreise).Unten rechts ist besonders gut der Übergang der tight junctions von der E- in die P-Seite zu sehen.

9
0,5 µm

Bild 10

Die canaliculäre Membran ist durch den Einfluß von Taurolithocholat derart verändert, daß lang ausgestreckte Mikrovilli nahezu das gesamte Lumen des Gallekanälchens ausfüllen. Dabei tritt das organellenfreie Ectoplasma deutlich hervor.
Die Zellen wurden am 1. Kulturtag 3 Stunden lang mit 0,1 mM TLC inkubiert. Keine Filipinbehandlung.

unten

Es ist ein gleichartig transformierter Canaliculus im Gefrierbruch dargestellt. Die Abwesenheit von Filipin-Cholesterin-Komplexen zeigt an, daß sich kein Cholesterin in diesen glatten Membranstapeln befindet.
Eine 6-stündige Behandlung mit 0,1 mM TLC erfolgte am 1.Kulturtag.
Maßstäbe: 1 µm

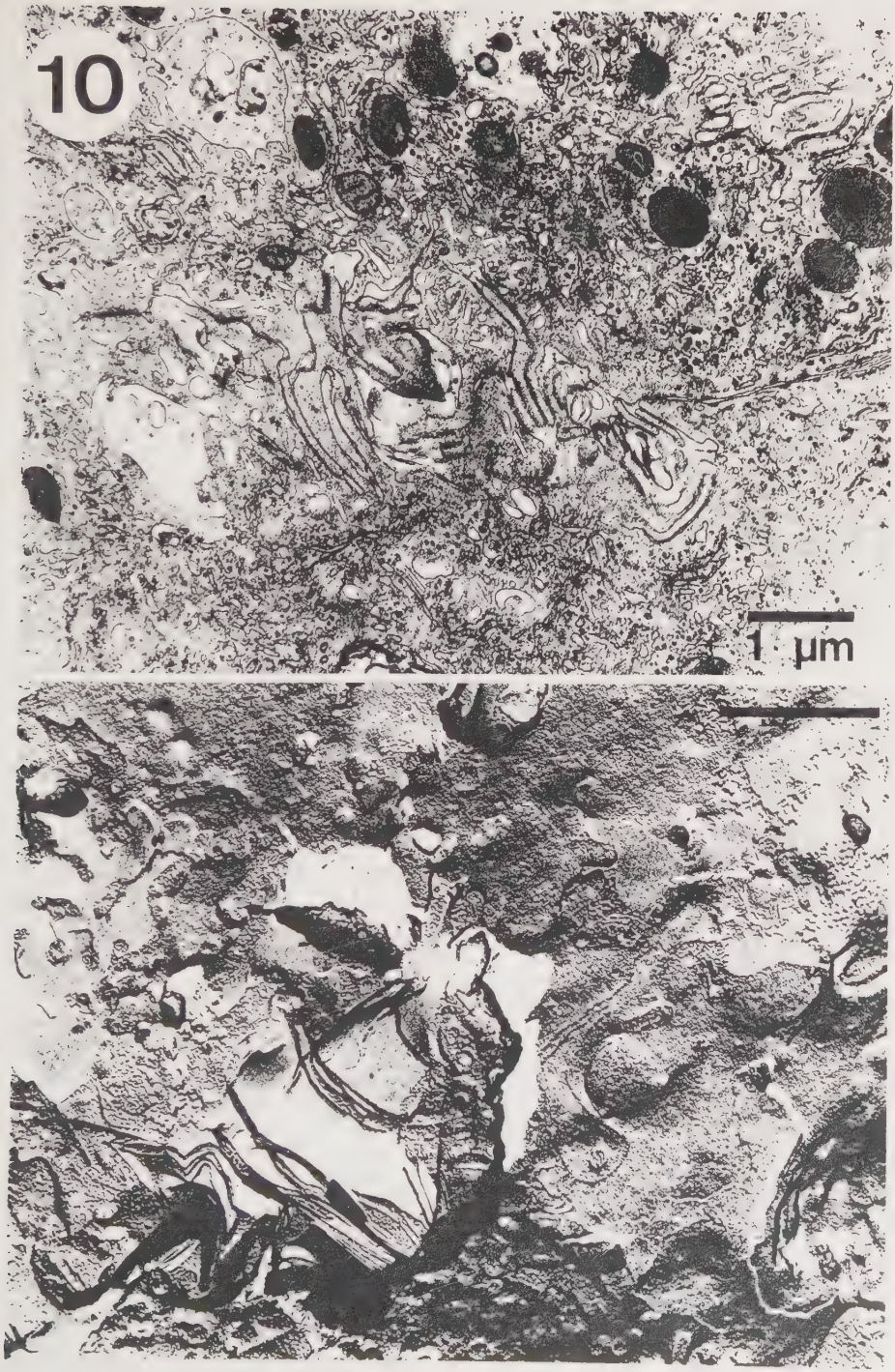

10
1 µm

Bild 11

rechts

Noch ausgeprägter als in Bild 10 ist die bizarre Verformung dieses Gallekanälchens, das sich auch durch ein besonders auffälliges, amorphes Ectoplasma auszeichnet. Der Canaliculus entstammt einer Kultur, die am 3. Tag 3 Stunden lang mit 0,1 mM TLC behandelt wurde. Kein Filipin.

links

Die vollkommen glatten Membranen enthalten weder Filipin-Cholesterin-Komplexe noch Intramembranpartikel. Lediglich kleine, cholesterinreiche Vesikel befinden sich innerhalb des Lumens (Pfeil). Tight junctions umgeben das Gallekanälchen; sie sind durch Pfeilköpfe markiert. Die Zellen wurden nach einem Kulturtag und 6-stündiger Inkubation mit 0,1 mM TLC eingebettet.

Maßstäbe: 1 µm

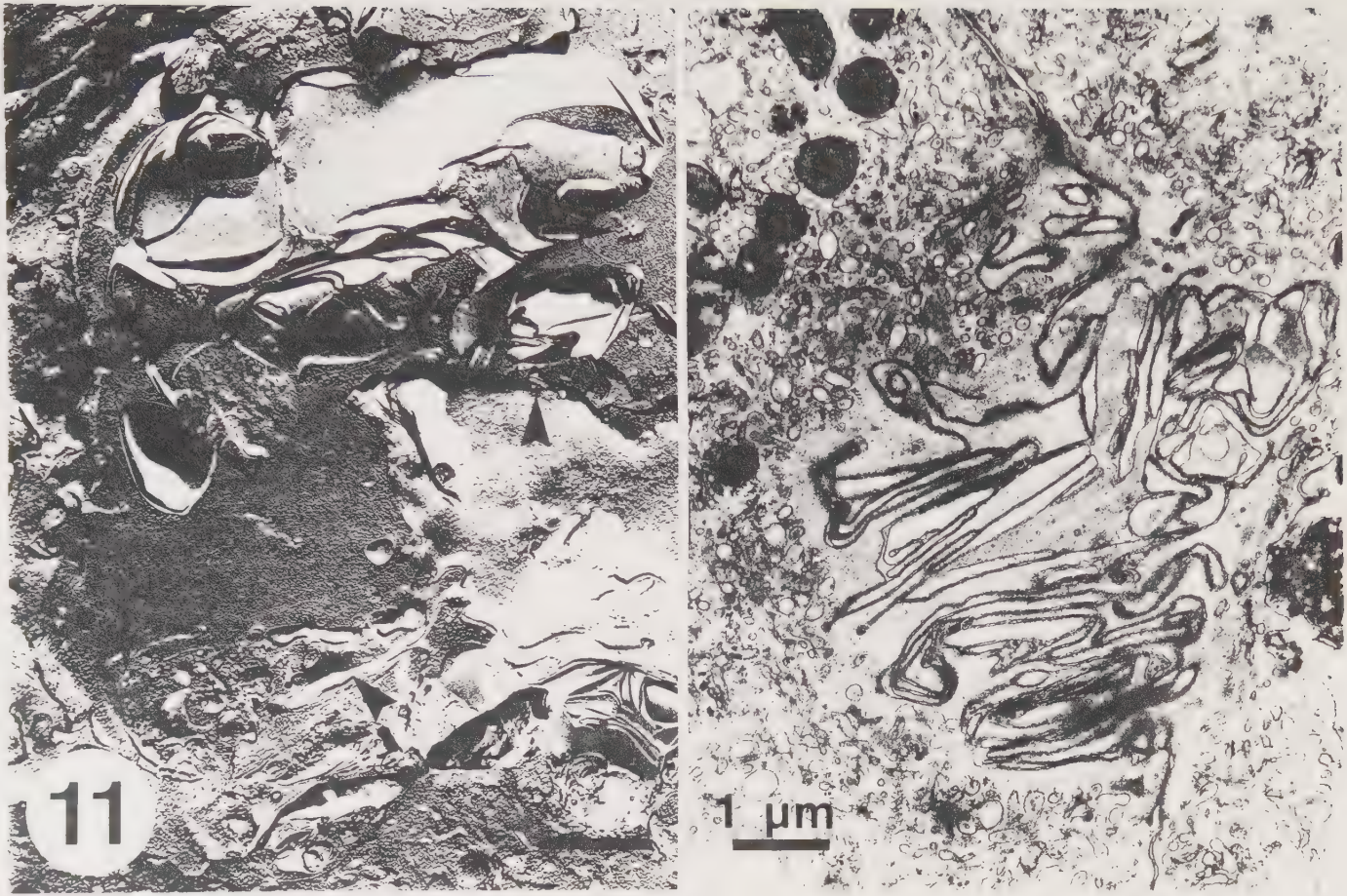

11
1 µm

Bild 12

Intensiv korrugiertes Membranmaterial findet sich in diesen Gallekanälchen. Offenbar ist es durch Ablösen der canaliculären Membran, die selbst Korrugationen aufweist, ins Lumen gelangt, wie aus dem Bild rechts unten geschlossen werden kann.

Durch die Filipin-Cholesterin-Komplexe erhalten quergeschnittene Membranen ein wellblechartiges Aussehen. Im Anschnitt in der Membranebene erscheinen die Komplexe als kleine Kreise (unten rechts), die den gleichen Durchmesser haben wie die Protuberanzen im Gefrierbruch (vergl. Bild 13).

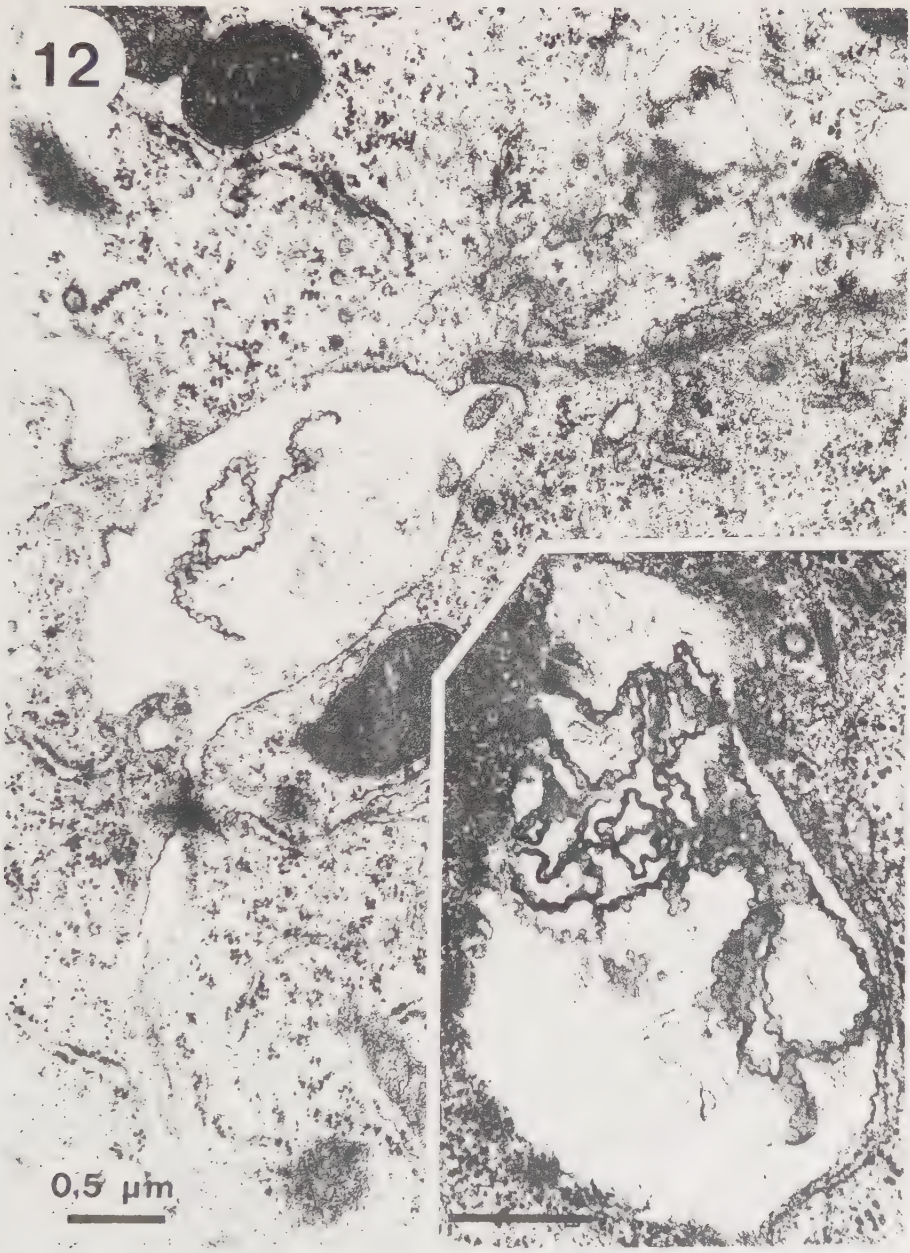

12
0,5 µm

Bild 13

Ein zu Bild 12 korrespondierender Gefrierbruch zeigt die Anhäufung von Filipin-Cholesterin-Clustern in der Membran des Gallekanälchens bzw. in dessen Lumen sowie in der angrenzenden lateralen Membran (links). Die tight junction-Ausbildung ist noch unvollständig und setzt sich in einer sog. tight-junction -Formationszone fort (Pfeil; vergl. dazu Ref. 35).

Die Zellen wurden am 1. Kulturtag 3 Stunden lang mit 0,1 mM TLC behandelt.

13
0,5 µm

Bild 14

links

Proliferierte tight junctions, die große Flächen der Lateralmembran einnehmen, sind aus der Sicht des Gefrierbruchs dargestellt. Oben rechts ist ein Gallekanälchen (BC) zu sehen, dessen Lumen mit z.T. glattem und z.T. cholesterinreichem Membranmaterial aufgefüllt ist (Stern). Die Pfeile weisen auf Übergänge zwischen E- und P-Seite, der Pfeilkopf auf tight junction-Stränge, die nur schemenhaft abgebildet sind.
Eine 3-stündige Inkubation mit 0,1 mM TLC erfolgte am ersten Kulturtag.

rechts

Im Ultradünnschnitt wird, entsprechend der Darstellungsweise, nahezu der gesamte Interzellularspalt von den zonulae occludentes eingenommen, wobei an einigen Stellen distinkte Kontaktpunkte zwischen den benachbarten Lateralmembranen zu erkennen sind (Pfeile).
Beide Maßstäbe geben eine Länge von 0,1 µm an.

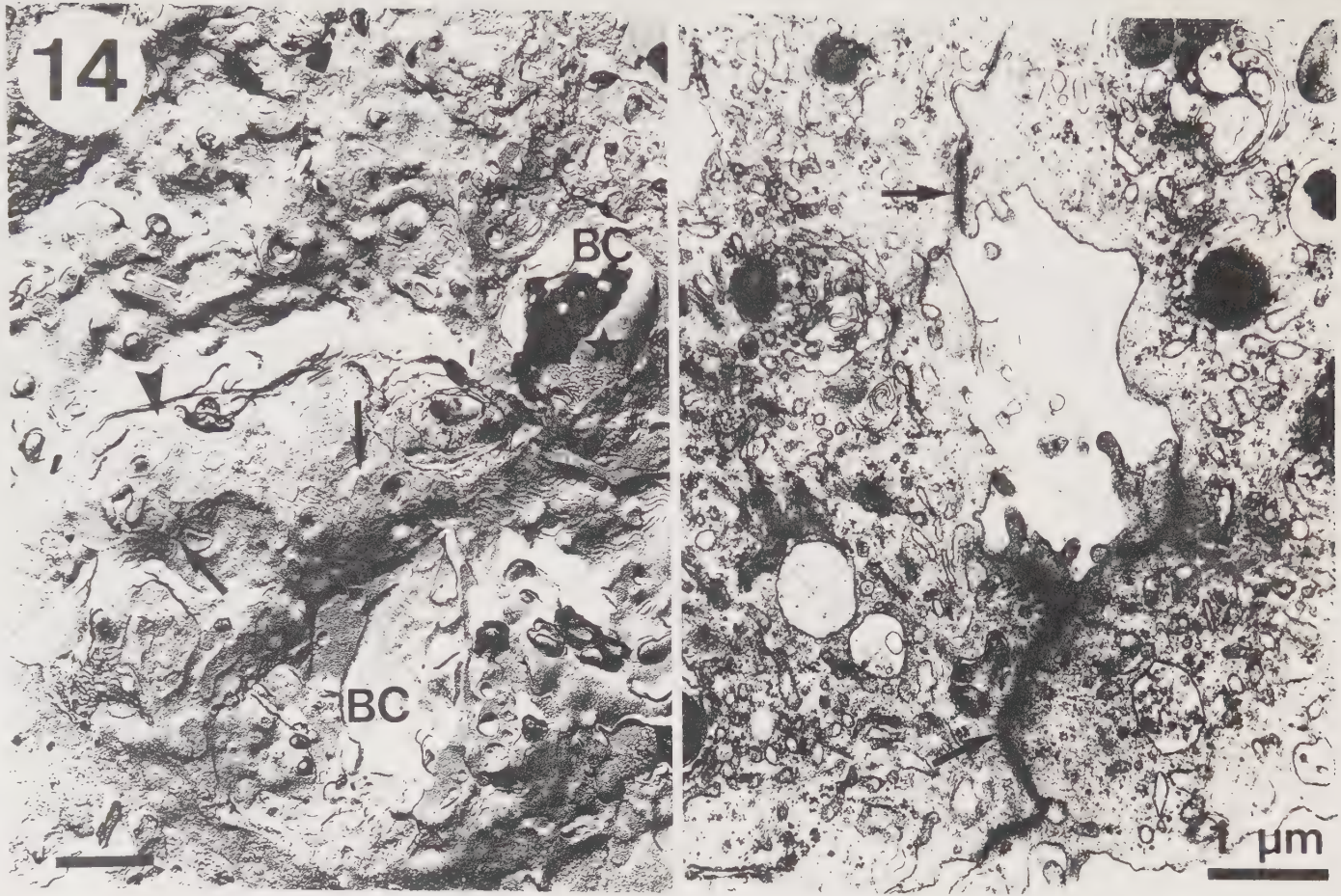

14
BC
BC
1 µm

Bild 15

Mitte

Die Abbildung zeigt einen stark divertikulierten Canaliculus aus einer Kultur, die während des gesamten zweiten Tages (von 24 bis 48 Stunden) mit 0,1 mM CPZ behandelt worden war. An Hand des Schnittbildes läßt sich nicht entscheiden, ob die großen Vesikel in der Nachbarschaft des Kanälchens mit dem Lumen Verbindung haben oder nicht.

oben rechts

Multilamelläre Vesikel sind in einem Lysosom eingeschlossen.

unten links

Der Ausschnitt demonstriert eine Läsion, die bereits nach 30-minütiger Inkubation mit einerhöheren CPZ-Konzentration (0,25 mM) auftrat: Kernmembran und rER sind dilatiert.

unten rechts

Das Lysosom enthält neben zahlreichen multilamellären Strukturen auch einen durch die Einwirkung von Filipin korrugierten Vesikel.

Alle Maßstäbe bedeuten 0,5 µm.

15

Bild 16

In diesem Gefrierbruchbild ist ein zu Bild 15 korrespondierendes, divertikuliertes Gallekanälchen (BC) dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Divertikuli (D), die den großen Vesikeln in Bild 15 entsprechen, mit dem Lumen in Verbindung stehen. Im Lumen, aber auch in den Divertikuli sind Mikrovilli zu finden (Pfeile). Auf tight junctions, die rund um den Canaliculus angeordnet sind, wird durch Pfeilköpfe hingewiesen.
Die Zellen, von denen dieses Bild stammt, wurden am 3. Kulturtag 2 Stunden lang mit 0,1 mM CPZ inkubiert und nach der Fixierung mit Filipin behandelt.

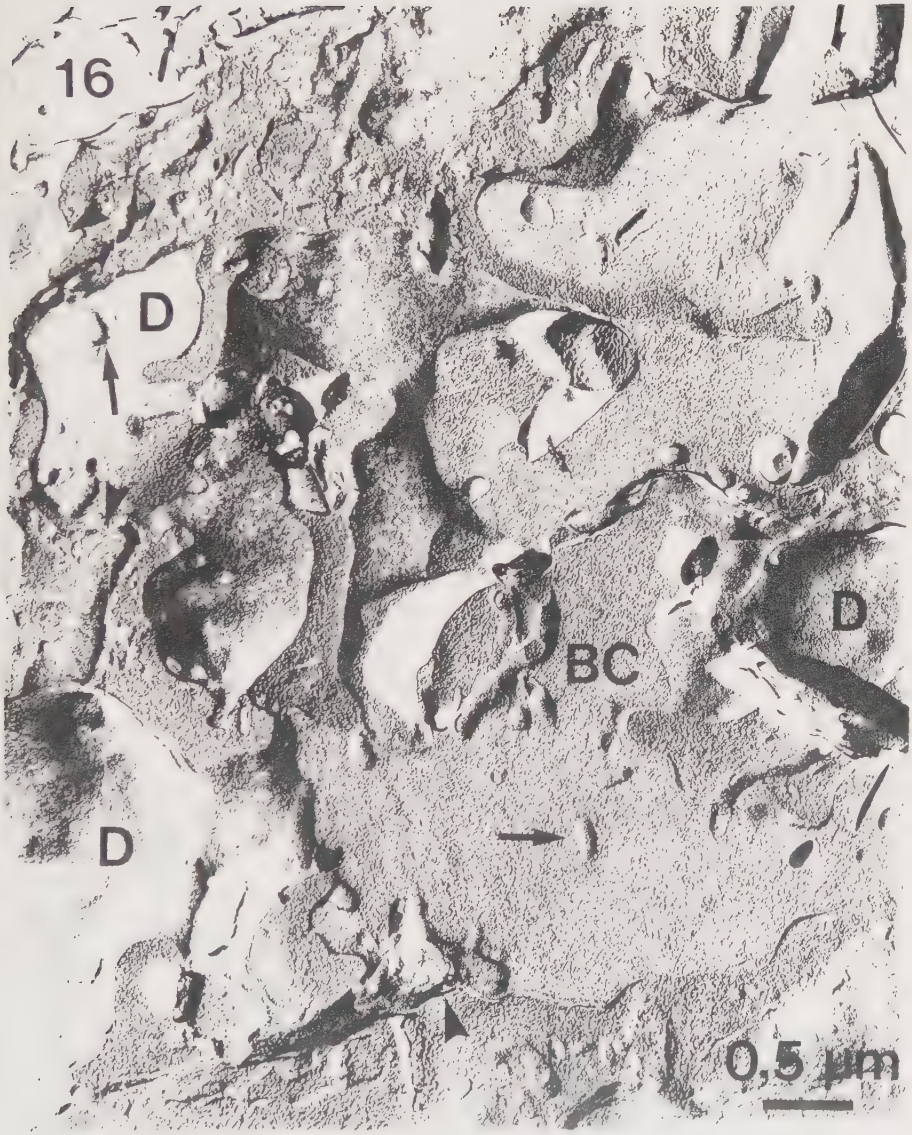

16
D
D
BC
D
0,5 µm

Bild 17

Ein Anhäufung von multilamellären Vesikeln als Folge länger andauernder Behandlung mit Chlorpromazin (von 4 bis 48 Stunden) zeigt die obere Bildhälfte. Im Gefrierbruch stellen sich die myelinartigen Strukturen als glatte, von Filipin-Cholesterin-Komplexen freie Membranen dar (unten links). Aber auch eine kurzfristige Einwirkung der Droge in höheren Konzentrationen (2 Stunden 0,25 mM CPZ am 4. Kulturtag) führte zu äquivalenten Strukturen, die im Gefrierbruch leicht als Akkumulation von Membranfragmenten zu identifizieren sind (unten rechts).

Maßstäbe: 0,5 µm

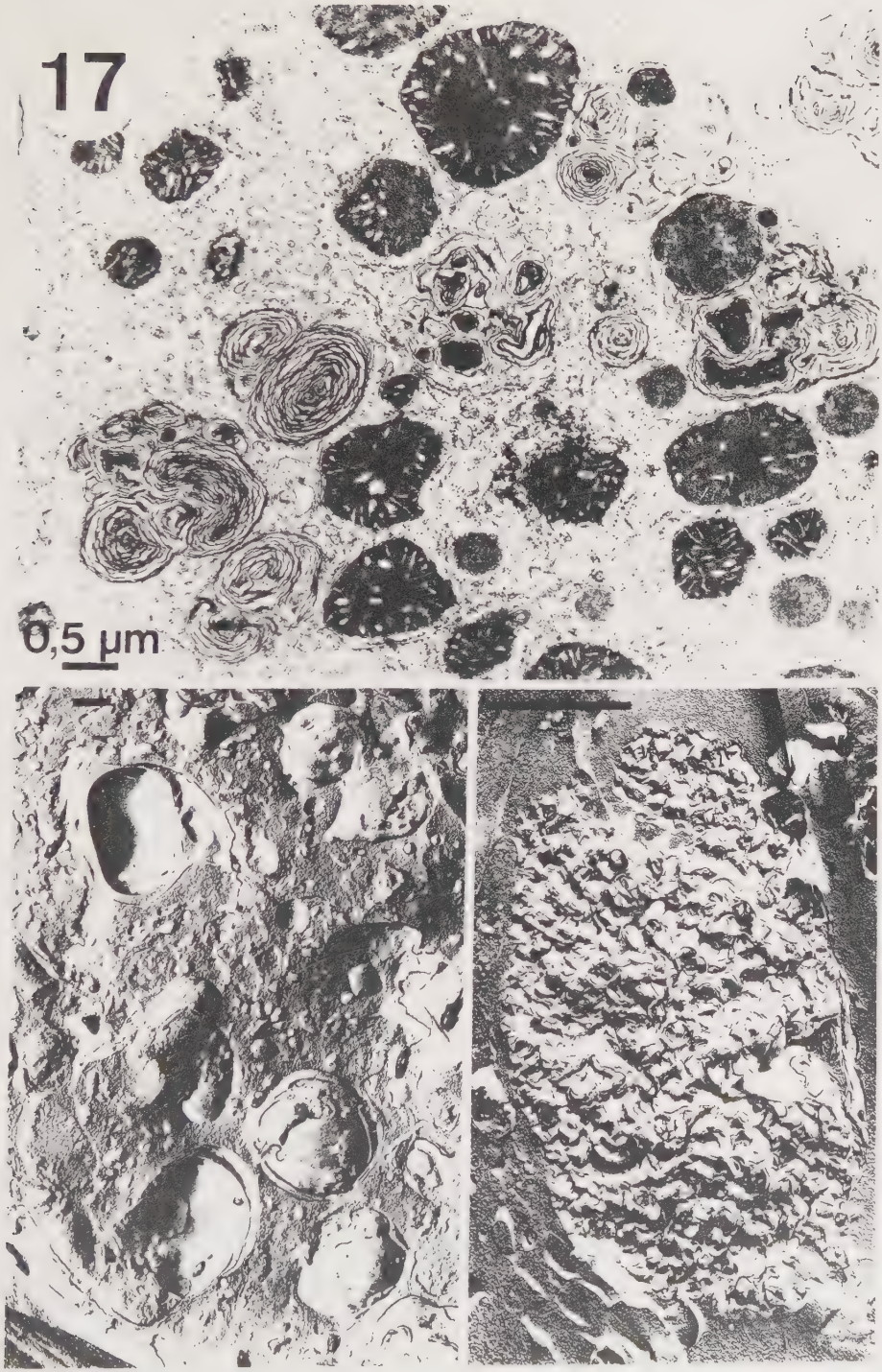

17
0,5 µm

Bild 18

Es ist der Ausschnitt einer Plasmamembran gezeigt, in der durch die 2-stündige Einwirkung von 0,25 mM Chlorpromazin am 4.Kulturtag eine Verschiebung und/oder Extraktion von Intramembranpartikeln stattgefunden hat. Dadurch sind Bereiche entstanden, in denen die Membran vollkommen glatt erscheint (Pfeile).

0.5 μm
18

Bild 19

Diese Aufnahmen entstanden am 3. Kulturtag. Die obere Bildhälfte zeigt eine Monolayer nach der Inkubation mit Fluorescein. Die Zellen haben den Farbstoff aufgenommen und in fest umrissenen Strukturen konzentriert, die im Phasenkontrastbild (unten) als Gallekanälchen zu identifizieren sind. Jedoch enthält umgekehrt nicht jede der als Gallekanälchen angesprochenen Strukturen auch den Farbstoff (Pfeilköpfe). Kultivierung mit Phenobarbital.

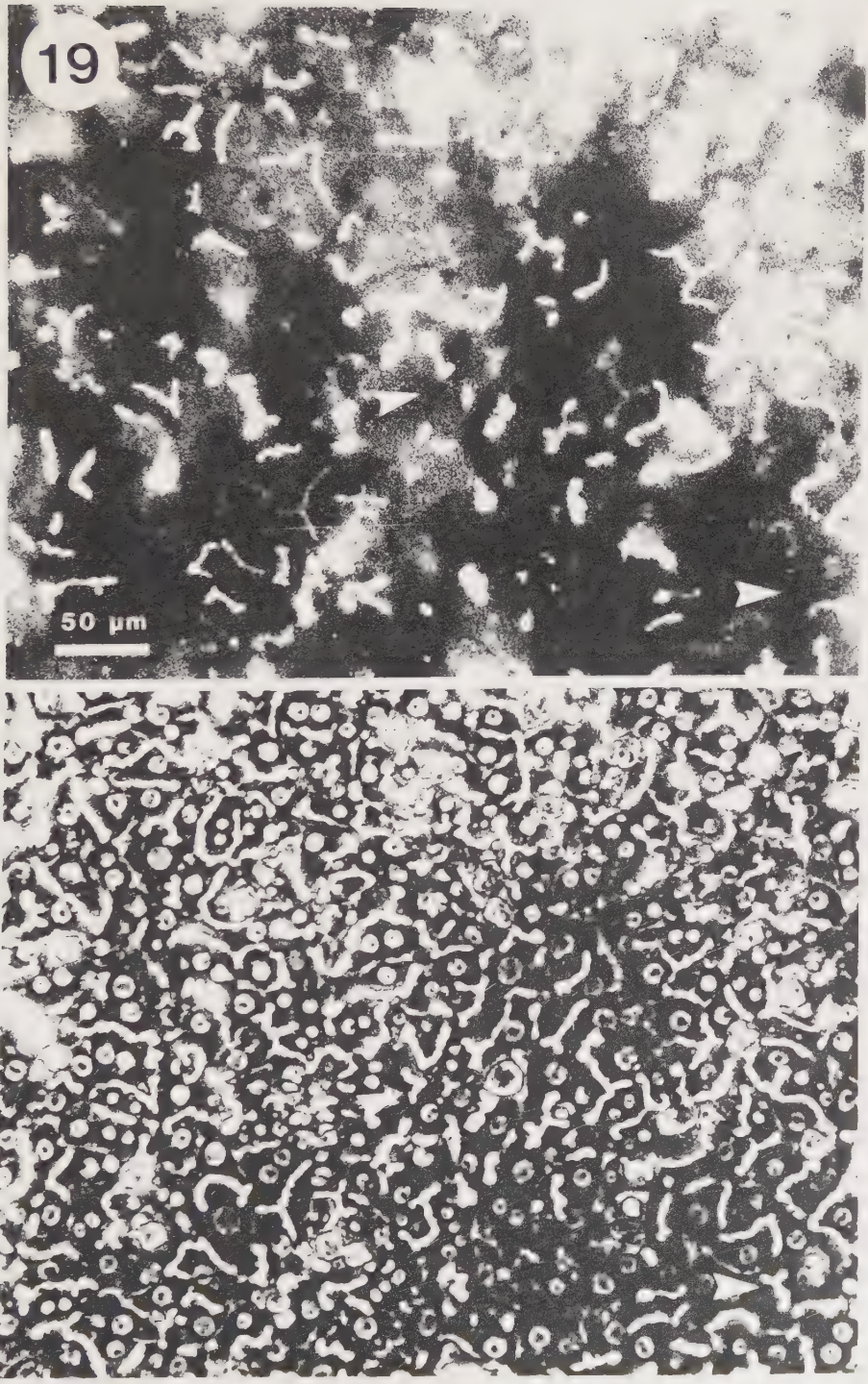

19
50 µm

Bild 20

Diese Zellen wurden am 4. Kulturtag mit Gly-FITC inkubiert. Im Gegensatz zu Bild 19 ist in den Zellen keine Fluoreszenz zu sehen. Die Gallekanälchen heben sich mit unterschiedlicher Intensität von dem schwarzen Hintergrund ab. Auch hier kann nicht zu jedem Gallekanälchen des Phasenkontrastbildes (unten) ein entsprechendes im Fluoreszenzbild zugeordnet werden (oben; Pfeilköpfe).
Phenobarbital war vom ersten Medienwechsel ab anwesend.

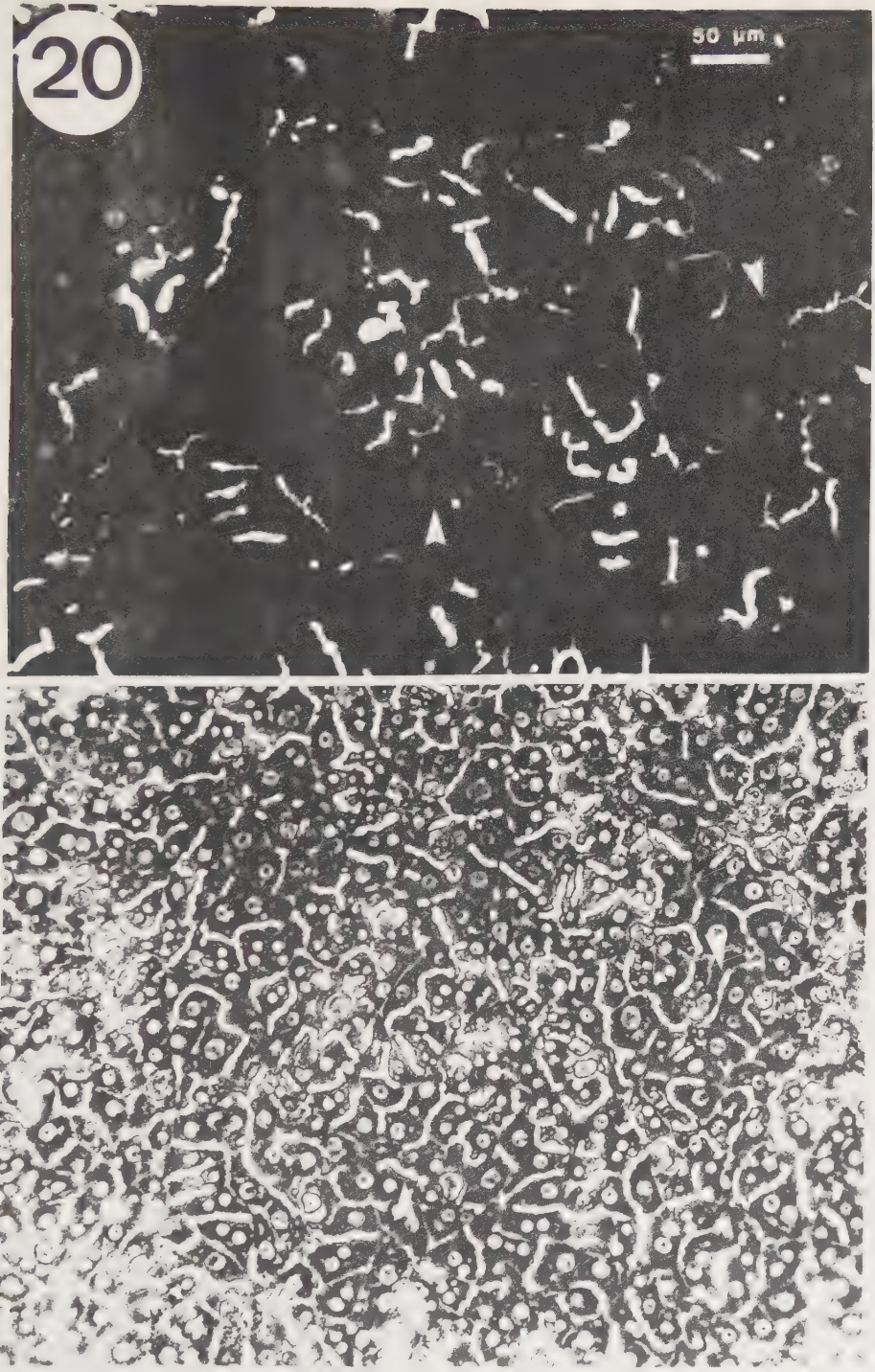

20
50 µm

Bild 21

Das Bild soll den Einfluß von Phenobarbital auf die Ausbildung der Gallekanälchen und auf die Sekretion von Gly-FITC demonstrieren. Zwar hatte sich bis zum 4. Kulturtag auch ohne die Anwesenheit des Arzneistoffes ein ausgeprägtes Netzwerk von schlanken Gallekanälchen entwickelt, in welches der Farbstoff sezerniert wurde (obere Bildhälfte), jedoch erschienen die Gallekanälchen nach der Behandlung mit Phenobarbital vom ersten Medienwechsel ab voluminöser; die Inkubation mit Gly-FITC führte zu hell leuchtenden, schlauchartigen Strukturen (untere Bildhälfte).

21
50 µm

Bild 22

Die hier gezeigte Übersicht entstand am 4. Kulturtag, nachdem Gly-FITC-haltiges Medium entfernt, die Monolayer mit Saline gewaschen und 1 Minute lang mit einer 1 M Sucroselösung versetzt worden war. von den ursprünglich mit Farbstoff prall gefüllten Gallekanälchen sind nur noch leuchtende Ränder übrig geblieben.

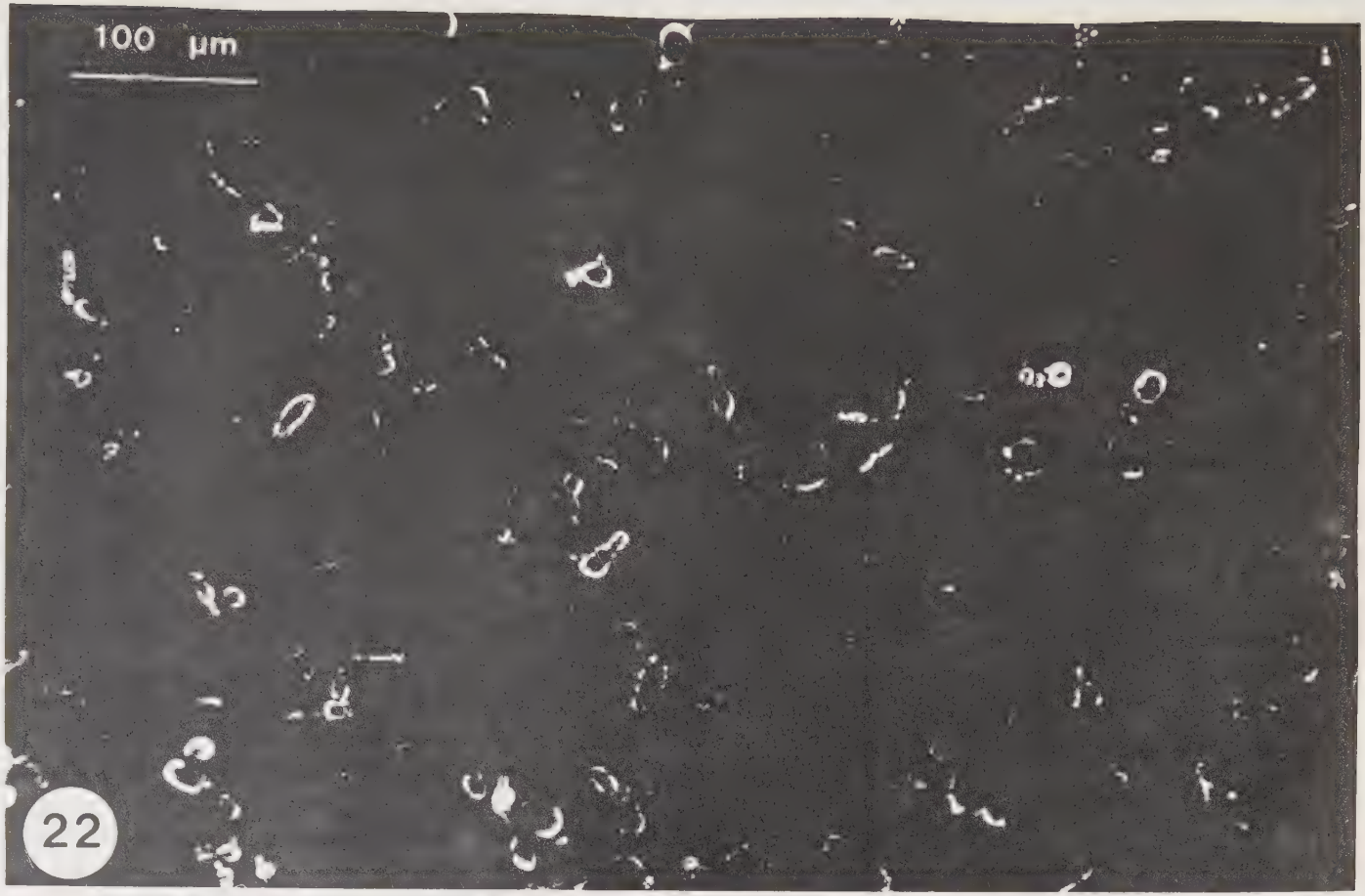

100 µm
22

Bild 23

Auch 5 Minuten (oben) bzw. 10 Minuten (unten) nach der Zugabe von 1 M Sucroselösung sind noch fluoreszierende Umrisse von Gallekanälchen vorhanden, wenngleich ihre Anzahl abgenommen hat. Eine Schädigung der Zellen, die auf die Behandlung mit Sucrose zurückzuführen wäre, ist nicht zu erkennen; im Phasenkontrastbild (untere Bildhälfte) erscheint ihre Struktur normal. Die Pfeile weisen auf korrespondierende Gallekanälchen hin, die z.T. blasenartig dilatiert sind (oben).

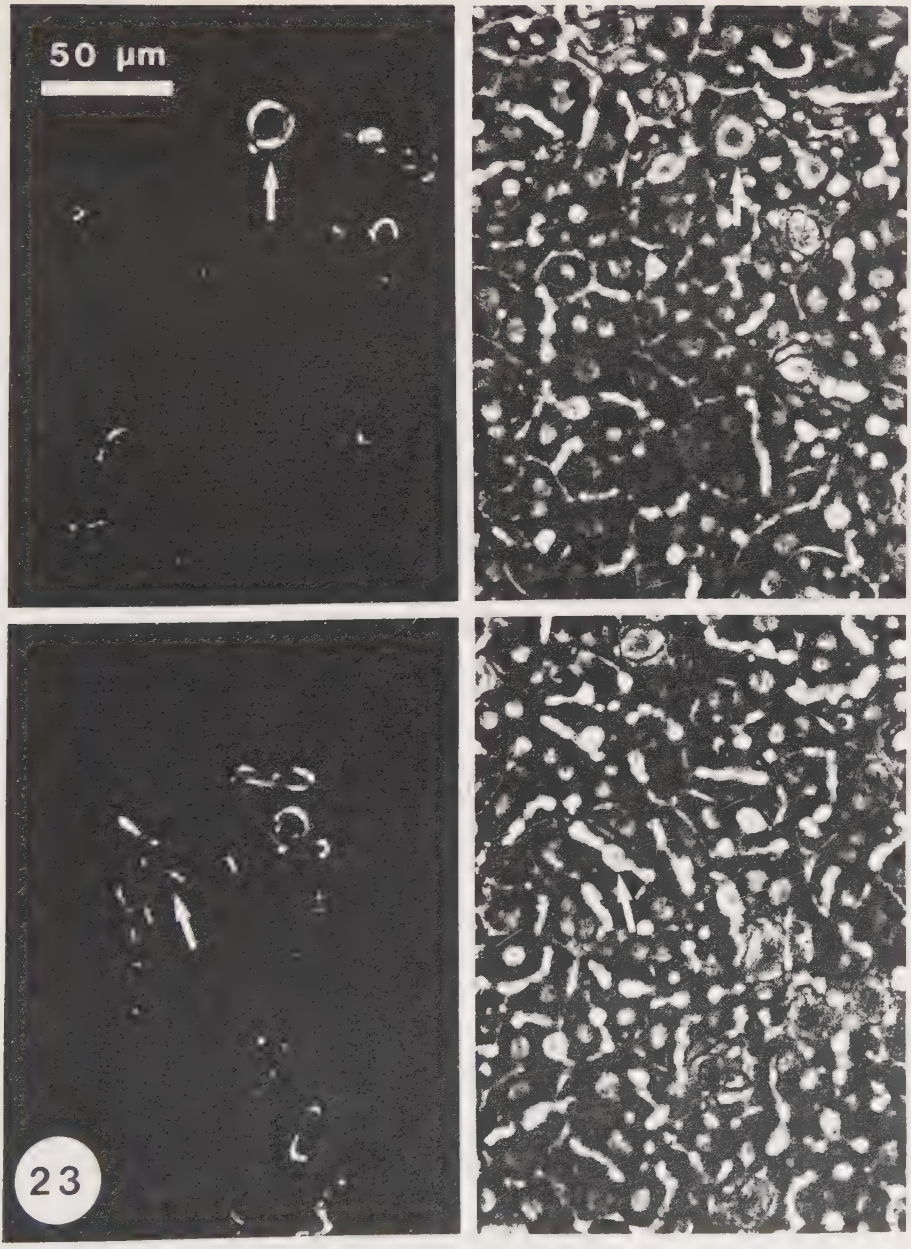

50 µm
23

Bild 24

In der oberen Bildhälfte ist eine Kultur dargestellt, die mit Gly-FITC in Natrium-freiem Medium inkubiert wurde. Obwohl im Phasenkontrastbild (oben rechts) einige Gallekanälchen zu sehen sind, ist das korrespondierende Fluoreszenzbild (oben links) absolut schwarz. Lediglich ein paar tote Zellen haben ein wenig von dem Farbstoff aufgenommen (Pfeilköpfe).
Die untere Bildhälfte zeigt die gleiche Monolayer, nachdem sie mit Gly-FITC in Natrium-haltigem Medium nachinkubiert worden war. Die Gallekanälchen haben wieder Fluoreszenz angereichert und heben sich als helles Netzwerk von den dunklen Zellen ab.

24
50 µm

Bild 25

Diese Zellen wurden gleichzeitg mit Fluoresceinamin (Isomer II) und Gly-FITC im Verhältnis 5:1 inkubiert. Die Fluoreszenzverteilung erscheint umgekert wie im gewohnten Bild: schwarze Zellzwischenräume (Pfeile), die das Phasenkontrastbild (unten) als Gallekanälchen ausweist, heben sich von einer hell leuchtenden Monolayer ab (oben).

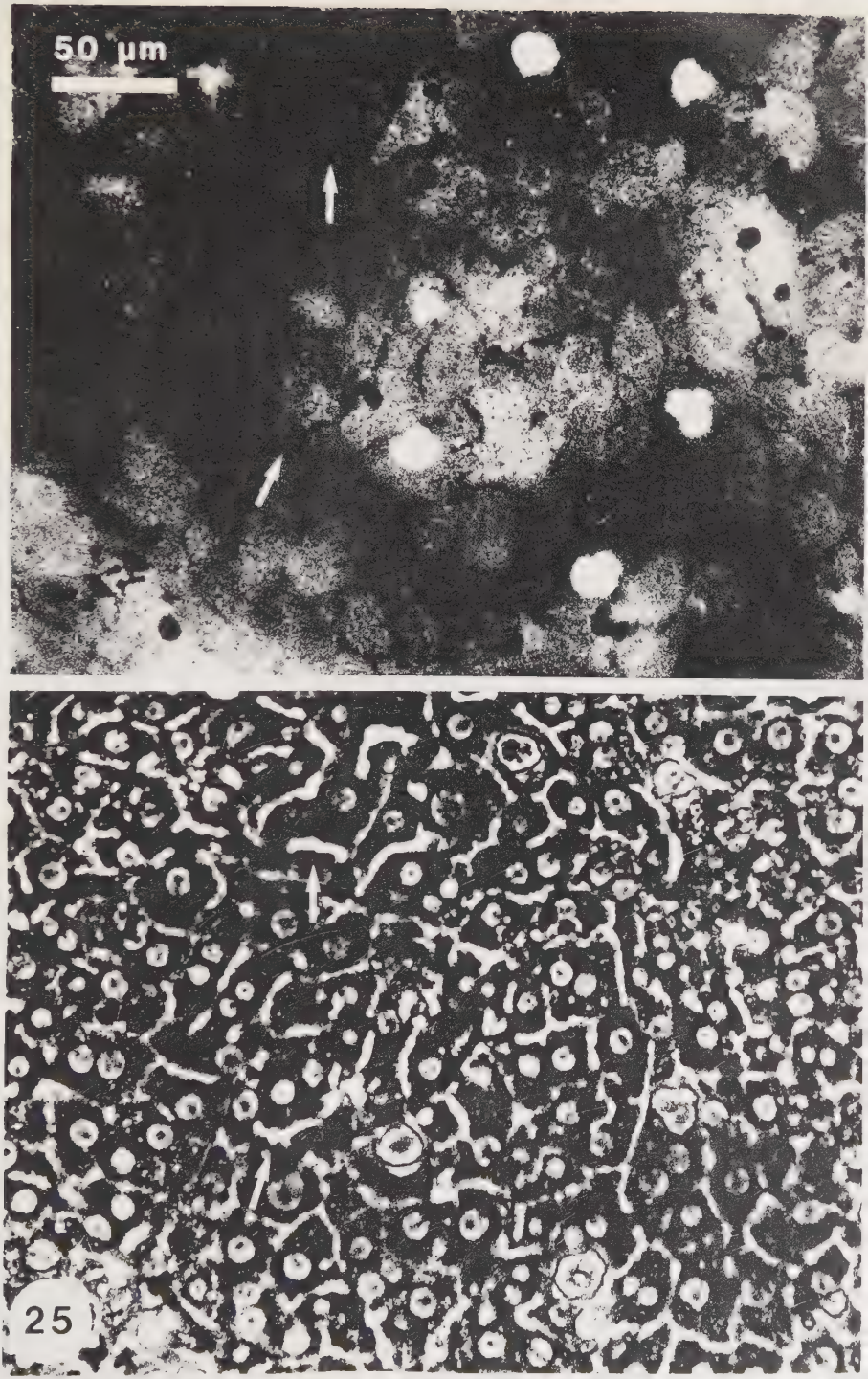

50 µm
25

Bild 26

An Hand dieses Bildes, das am 3. Kulturtag nach der Inkubation mit Lys-FITC entstand, soll gezeigt werden, daß alle untersuchten Aminosäurederivate des Fluoresceinisothiocyanats dem Gly-FITC ähnliche Transporteigenschaften aufwiesen. Die weißen punkte im Fluoreszenzbild (oben) markieren tote Zellen, die der Monolayer oben aufliegen.
Kultivierung mit Phenobarbital.

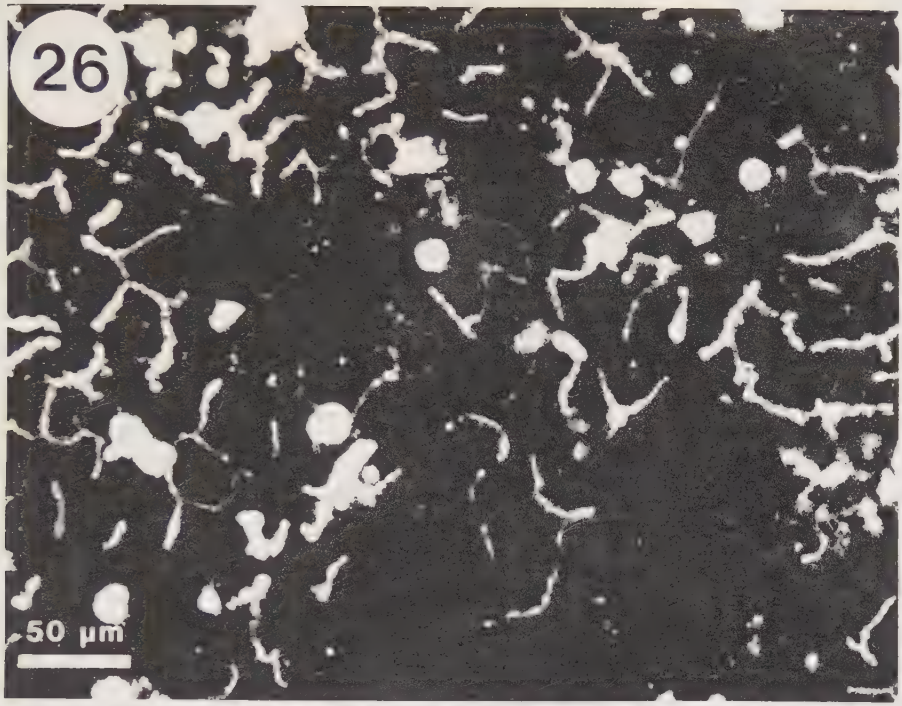

26
50 µm

Bild 27

Die Inkubation mit Methylamin-FITC führte zu einer moderaten Fluoreszenz der Monolayer und zu einer Anreicherung des Farbstoffes in den Gallekanälchen (Pfeile).
Kultivierung mit Insulin (25 U/l) und Dexamethason (10^{-6}M) für 2 Tage; Phenobarbital war vom 1. Medienwechsel ab anwesend.

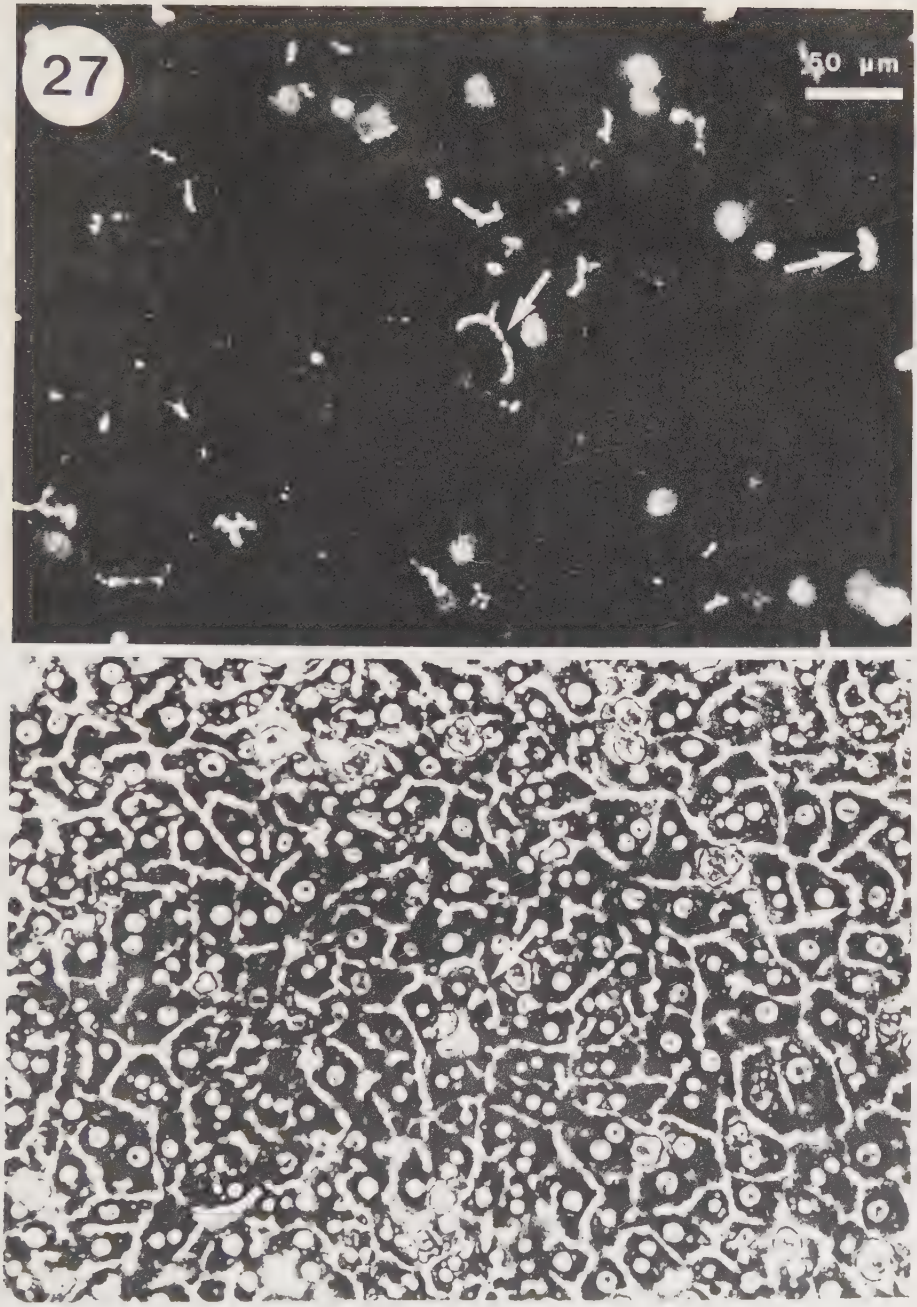
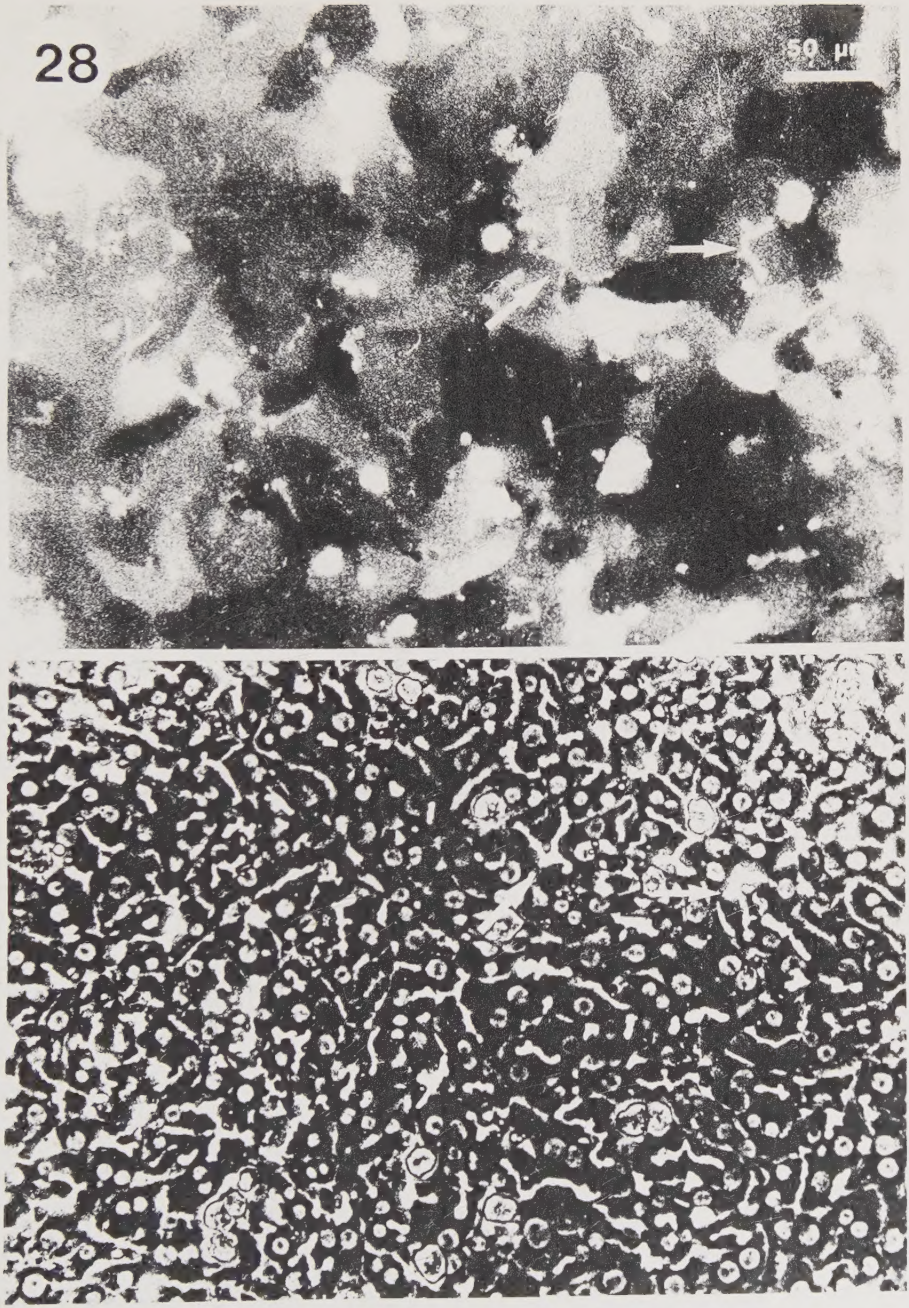

27
50 µm

Bild 28

Wurde den Kulturen Benzylamin-FITC angeboten, so ergab sich ein ähnliches Bild wie nach der Inkubation mit dem unmodifizierten Fluorescein (vergl. Bild 19): sowohl in den Zellen als auch in den Gallekanälchen war Fluoreszenz enthalten. Die Pfeile weisen auf korrespondierende Strukturen in den beiden Aufnahmen hin.
Kultivierung s. Bild 27.


28
50 µm

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 0 71 21/4 53 77